

**PHEROMONINDUZIERTE AKTIVITÄT IM BULBUS
OLFACTORIUS VON NEUGEBORENEN KANINCHEN:
EINE NEUROANATOMISCHE UNTERSUCHUNG MIT HILFE
DER 2-DESOXY-(14C-U)-GLUCOSE-METHODE**

JOHANN MICHAEL MARTIN

1986

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. E. Pöppel)

vorgelegt über Prof. Dr. Dr. habil. H.E. König
Lehrstuhl für Tieranatomie I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. B. Vollmerhaus)

Pheromoninduzierte Aktivität im Bulbus olfactorius
von neugeborenen Kaninchen: Eine neuroanatomische Untersuchung
mit Hilfe der 2-Desoxy-(14C-U)-Glucose-Methode.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Johann Michael Martin
aus
Grieskirchen

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.habil. H.E. König

Korreferent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Tabellarische Zusammenfassung

Einleitung	S. 1
1.1 Aufgabenstellung	S. 2
1.2 Zielsetzung	S. 3
1.3 Methodik	S. 4
2.1 Ergebnisse	S. 5
2.2 Diskussion	S. 6
3.1 Zusammenfassung	S. 7
3.2 Ausblick	S. 8
4.1 Literaturverzeichnis	S. 9
4.2 Quellenverzeichnis	S. 10
4.3 Anhang	S. 11
4.4 Glossar	S. 12
4.5 Index	S. 13
4.6 Bibliographie	S. 14
4.7 Literaturverzeichnis	S. 15
4.8 Quellenverzeichnis	S. 16
4.9 Anhang	S. 17
4.10 Glossar	S. 18
4.11 Index	S. 19
4.12 Bibliographie	S. 20
4.13 Literaturverzeichnis	S. 21
4.14 Quellenverzeichnis	S. 22
4.15 Anhang	S. 23
4.16 Glossar	S. 24
4.17 Index	S. 25
4.18 Bibliographie	S. 26
4.19 Literaturverzeichnis	S. 27
4.20 Quellenverzeichnis	S. 28
4.21 Anhang	S. 29
4.22 Glossar	S. 30
4.23 Index	S. 31
4.24 Bibliographie	S. 32
4.25 Literaturverzeichnis	S. 33
4.26 Quellenverzeichnis	S. 34
4.27 Anhang	S. 35
4.28 Glossar	S. 36
4.29 Index	S. 37
4.30 Bibliographie	S. 38
4.31 Literaturverzeichnis	S. 39
4.32 Quellenverzeichnis	S. 40
4.33 Anhang	S. 41
4.34 Glossar	S. 42
4.35 Index	S. 43
4.36 Bibliographie	S. 44
4.37 Literaturverzeichnis	S. 45
4.38 Quellenverzeichnis	S. 46
4.39 Anhang	S. 47
4.40 Glossar	S. 48
4.41 Index	S. 49
4.42 Bibliographie	S. 50
4.43 Literaturverzeichnis	S. 51
4.44 Quellenverzeichnis	S. 52
4.45 Anhang	S. 53
4.46 Glossar	S. 54
4.47 Index	S. 55
4.48 Bibliographie	S. 56
4.49 Literaturverzeichnis	S. 57
4.50 Quellenverzeichnis	S. 58
4.51 Anhang	S. 59
4.52 Glossar	S. 60
4.53 Index	S. 61
4.54 Bibliographie	S. 62
4.55 Literaturverzeichnis	S. 63
4.56 Quellenverzeichnis	S. 64
4.57 Anhang	S. 65
4.58 Glossar	S. 66
4.59 Index	S. 67
4.60 Bibliographie	S. 68
4.61 Literaturverzeichnis	S. 69
4.62 Quellenverzeichnis	S. 70
4.63 Anhang	S. 71
4.64 Glossar	S. 72
4.65 Index	S. 73
4.66 Bibliographie	S. 74
4.67 Literaturverzeichnis	S. 75
4.68 Quellenverzeichnis	S. 76
4.69 Anhang	S. 77
4.70 Glossar	S. 78
4.71 Index	S. 79
4.72 Bibliographie	S. 80
4.73 Literaturverzeichnis	S. 81
4.74 Quellenverzeichnis	S. 82
4.75 Anhang	S. 83
4.76 Glossar	S. 84
4.77 Index	S. 85
4.78 Bibliographie	S. 86
4.79 Literaturverzeichnis	S. 87
4.80 Quellenverzeichnis	S. 88
4.81 Anhang	S. 89
4.82 Glossar	S. 90
4.83 Index	S. 91
4.84 Bibliographie	S. 92
4.85 Literaturverzeichnis	S. 93
4.86 Quellenverzeichnis	S. 94
4.87 Anhang	S. 95
4.88 Glossar	S. 96
4.89 Index	S. 97
4.90 Bibliographie	S. 98
4.91 Literaturverzeichnis	S. 99
4.92 Quellenverzeichnis	S. 100
4.93 Anhang	S. 101
4.94 Glossar	S. 102
4.95 Index	S. 103
4.96 Bibliographie	S. 104
4.97 Literaturverzeichnis	S. 105
4.98 Quellenverzeichnis	S. 106
4.99 Anhang	S. 107
4.100 Glossar	S. 108
4.101 Index	S. 109
4.102 Bibliographie	S. 110
4.103 Literaturverzeichnis	S. 111
4.104 Quellenverzeichnis	S. 112
4.105 Anhang	S. 113
4.106 Glossar	S. 114
4.107 Index	S. 115
4.108 Bibliographie	S. 116
4.109 Literaturverzeichnis	S. 117
4.110 Quellenverzeichnis	S. 118
4.111 Anhang	S. 119
4.112 Glossar	S. 120
4.113 Index	S. 121
4.114 Bibliographie	S. 122
4.115 Literaturverzeichnis	S. 123
4.116 Quellenverzeichnis	S. 124
4.117 Anhang	S. 125
4.118 Glossar	S. 126
4.119 Index	S. 127
4.120 Bibliographie	S. 128
4.121 Literaturverzeichnis	S. 129
4.122 Quellenverzeichnis	S. 130
4.123 Anhang	S. 131
4.124 Glossar	S. 132
4.125 Index	S. 133
4.126 Bibliographie	S. 134
4.127 Literaturverzeichnis	S. 135
4.128 Quellenverzeichnis	S. 136
4.129 Anhang	S. 137
4.130 Glossar	S. 138
4.131 Index	S. 139
4.132 Bibliographie	S. 140
4.133 Literaturverzeichnis	S. 141
4.134 Quellenverzeichnis	S. 142
4.135 Anhang	S. 143
4.136 Glossar	S. 144
4.137 Index	S. 145
4.138 Bibliographie	S. 146
4.139 Literaturverzeichnis	S. 147
4.140 Quellenverzeichnis	S. 148
4.141 Anhang	S. 149
4.142 Glossar	S. 150
4.143 Index	S. 151
4.144 Bibliographie	S. 152
4.145 Literaturverzeichnis	S. 153
4.146 Quellenverzeichnis	S. 154
4.147 Anhang	S. 155
4.148 Glossar	S. 156
4.149 Index	S. 157
4.150 Bibliographie	S. 158
4.151 Literaturverzeichnis	S. 159
4.152 Quellenverzeichnis	S. 160
4.153 Anhang	S. 161
4.154 Glossar	S. 162
4.155 Index	S. 163
4.156 Bibliographie	S. 164
4.157 Literaturverzeichnis	S. 165
4.158 Quellenverzeichnis	S. 166
4.159 Anhang	S. 167
4.160 Glossar	S. 168
4.161 Index	S. 169
4.162 Bibliographie	S. 170
4.163 Literaturverzeichnis	S. 171
4.164 Quellenverzeichnis	S. 172
4.165 Anhang	S. 173
4.166 Glossar	S. 174
4.167 Index	S. 175
4.168 Bibliographie	S. 176
4.169 Literaturverzeichnis	S. 177
4.170 Quellenverzeichnis	S. 178
4.171 Anhang	S. 179
4.172 Glossar	S. 180
4.173 Index	S. 181
4.174 Bibliographie	S. 182
4.175 Literaturverzeichnis	S. 183
4.176 Quellenverzeichnis	S. 184
4.177 Anhang	S. 185
4.178 Glossar	S. 186
4.179 Index	S. 187
4.180 Bibliographie	S. 188
4.181 Literaturverzeichnis	S. 189
4.182 Quellenverzeichnis	S. 190
4.183 Anhang	S. 191
4.184 Glossar	S. 192
4.185 Index	S. 193
4.186 Bibliographie	S. 194
4.187 Literaturverzeichnis	S. 195
4.188 Quellenverzeichnis	S. 196
4.189 Anhang	S. 197
4.190 Glossar	S. 198
4.191 Index	S. 199
4.192 Bibliographie	S. 200
4.193 Literaturverzeichnis	S. 201
4.194 Quellenverzeichnis	S. 202
4.195 Anhang	S. 203
4.196 Glossar	S. 204
4.197 Index	S. 205
4.198 Bibliographie	S. 206
4.199 Literaturverzeichnis	S. 207
4.200 Quellenverzeichnis	S. 208
4.201 Anhang	S. 209
4.202 Glossar	S. 210
4.203 Index	S. 211
4.204 Bibliographie	S. 212
4.205 Literaturverzeichnis	S. 213
4.206 Quellenverzeichnis	S. 214
4.207 Anhang	S. 215
4.208 Glossar	S. 216
4.209 Index	S. 217
4.210 Bibliographie	S. 218
4.211 Literaturverzeichnis	S. 219
4.212 Quellenverzeichnis	S. 220
4.213 Anhang	S. 221
4.214 Glossar	S. 222
4.215 Index	S. 223
4.216 Bibliographie	S. 224
4.217 Literaturverzeichnis	S. 225
4.218 Quellenverzeichnis	S. 226
4.219 Anhang	S. 227
4.220 Glossar	S. 228
4.221 Index	S. 229
4.222 Bibliographie	S. 230
4.223 Literaturverzeichnis	S. 231
4.224 Quellenverzeichnis	S. 232
4.225 Anhang	S. 233
4.226 Glossar	S. 234
4.227 Index	S. 235
4.228 Bibliographie	S. 236
4.229 Literaturverzeichnis	S. 237
4.230 Quellenverzeichnis	S. 238
4.231 Anhang	S. 239
4.232 Glossar	S. 240
4.233 Index	S. 241
4.234 Bibliographie	S. 242
4.235 Literaturverzeichnis	S. 243
4.236 Quellenverzeichnis	S. 244
4.237 Anhang	S. 245
4.238 Glossar	S. 246
4.239 Index	S. 247
4.240 Bibliographie	S. 248
4.241 Literaturverzeichnis	S. 249
4.242 Quellenverzeichnis	S. 250
4.243 Anhang	S. 251
4.244 Glossar	S. 252
4.245 Index	S. 253
4.246 Bibliographie	S. 254
4.247 Literaturverzeichnis	S. 255
4.248 Quellenverzeichnis	S. 256
4.249 Anhang	S. 257
4.250 Glossar	S. 258
4.251 Index	S. 259
4.252 Bibliographie	S. 260
4.253 Literaturverzeichnis	S. 261
4.254 Quellenverzeichnis	S. 262
4.255 Anhang	S. 263
4.256 Glossar	S. 264
4.257 Index	S. 265
4.258 Bibliographie	S. 266
4.259 Literaturverzeichnis	S. 267
4.260 Quellenverzeichnis	S. 268
4.261 Anhang	S. 269
4.262 Glossar	S. 270
4.263 Index	S. 271
4.264 Bibliographie	S. 272
4.265 Literaturverzeichnis	S. 273
4.266 Quellenverzeichnis	S. 274
4.267 Anhang	S. 275
4.268 Glossar	S. 276
4.269 Index	S. 277
4.270 Bibliographie	S. 278
4.271 Literaturverzeichnis	S. 279
4.272 Quellenverzeichnis	S. 280
4.273 Anhang	S. 281
4.274 Glossar	S. 282
4.275 Index	S. 283
4.276 Bibliographie	S. 284
4.277 Literaturverzeichnis	S. 285
4.278 Quellenverzeichnis	S. 286
4.279 Anhang	S. 287
4.280 Glossar	S. 288
4.281 Index	S. 289
4.282 Bibliographie	S. 290
4.283 Literaturverzeichnis	S. 291
4.284 Quellenverzeichnis	S. 292
4.285 Anhang	S. 293
4.286 Glossar	S. 294
4.287 Index	S. 295
4.288 Bibliographie	S. 296
4.289 Literaturverzeichnis	S. 297
4.290 Quellenverzeichnis	S. 298
4.291 Anhang	S. 299
4.292 Glossar	S. 300
4.293 Index	S. 301
4.294 Bibliographie	S. 302
4.295 Literaturverzeichnis	S. 303
4.296 Quellenverzeichnis	S. 304
4.297 Anhang	S. 305
4.298 Glossar	S. 306
4.299 Index	S. 307
4.300 Bibliographie	S. 308
4.301 Literaturverzeichnis	S. 309
4.302 Quellenverzeichnis	S. 310
4.303 Anhang	S. 311
4.304 Glossar	S. 312
4.305 Index	S. 313
4.306 Bibliographie	S. 314
4.307 Literaturverzeichnis	S. 315
4.308 Quellenverzeichnis	S. 316
4.309 Anhang	S. 317
4.310 Glossar	S. 318
4.311 Index	S. 319
4.312 Bibliographie	S. 320
4.313 Literaturverzeichnis	S. 321
4.314 Quellenverzeichnis	S. 322
4.315 Anhang	S. 323
4.316 Glossar	S. 324
4.317 Index	S. 325
4.318 Bibliographie	S. 326
4.319 Literaturverzeichnis	S. 327
4.320 Quellenverzeichnis	S. 328
4.321 Anhang	S. 329
4.322 Glossar	S. 330
4.323 Index	S. 331
4.324 Bibliographie	S. 332
4.325 Literaturverzeichnis	S. 333
4.326 Quellenverzeichnis	S. 334
4.327 Anhang	S. 335
4.328 Glossar	S. 336
4.329 Index	S. 337
4.330 Bibliographie	S. 338
4.331 Literaturverzeichnis	S. 339
4.332 Quellenverzeichnis	S. 340
4.333 Anhang	S. 341
4.334 Glossar	S. 342
4.335 Index	S. 343
4.336 Bibliographie	S. 344
4.337 Literaturverzeichnis	S. 345
4.338 Quellenverzeichnis	S. 346
4.339 Anhang	S. 347
4.340 Glossar	S. 348
4.341 Index	S. 349
4.342 Bibliographie	S. 350
4.343 Literaturverzeichnis	S. 351
4.344 Quellenverzeichnis	S. 352
4.345 Anhang	S. 353
4.346 Glossar	S. 354
4.347 Index	S. 355
4.348 Bibliographie	S. 356
4.349 Literaturverzeichnis	S. 357
4.350 Quellenverzeichnis	S. 358
4.351 Anhang	S. 359
4.352 Glossar	S. 360
4.353 Index	S. 361
4.354 Bibliographie	S. 362
4.355 Literaturverzeichnis	S. 363
4.356 Quellenverzeichnis	S. 364
4.357 Anhang	S. 365
4.358 Glossar	S. 366
4.359 Index	S. 367
4.360 Bibliographie	S. 368
4.361 Literaturverzeichnis	S. 369
4.362 Quellenverzeichnis	S. 370
4.363 Anhang	S. 371
4.364 Glossar	S. 372
4.365 Index	S. 373
4.366 Bibliographie	S. 374
4.367 Literaturverzeichnis	S. 375
4.368 Quellenverzeichnis	S. 376
4.369 Anhang	S. 377
4.370 Glossar	S. 378
4.371 Index	S. 379
4.372 Bibliographie	S. 380
4.373 Literaturverzeichnis	S. 381
4.374 Quellenverzeichnis	S. 382
4.375 Anhang	S. 383
4.376 Glossar	S. 384
4.377 Index	S. 385
4.378 Bibliographie	S. 386
4.379 Literaturverzeichnis	S. 387
4.380 Quellenverzeichnis	S. 388
4.381 Anhang	S. 389
4.382 Glossar	S. 390
4.383 Index	S. 391
4.384 Bibliographie	S. 392
4.385 Literaturverzeichnis	S. 393
4.386 Quellenverzeichnis	S. 394
4.387 Anhang	S. 395
4.388 Glossar	S. 396
4.389 Index	S. 397
4.390 Bibliographie	S. 398
4.391 Literaturverzeichnis	S. 399
4.392 Quellenverzeichnis	S. 400
4.393 Anhang	S. 401
4.394 Glossar	S. 402
4.395 Index	S. 403
4.396 Bibliographie	S. 404
4.397 Literaturverzeichnis	S. 405
4.398 Quellenverzeichnis	S. 406
4.399 Anhang	S. 407
4.400 Glossar	S. 408
4.401 Index	S. 409
4.402 Bibliographie	S. 410
4.403 Literaturverzeichnis	S. 411
4.404 Quellenverzeichnis	S. 412
4.405 Anhang	S. 413
4.406 Glossar	S. 414
4.407 Index	S. 415
4.408 Bibliographie	S. 416
4.409 Literaturverzeichnis	S. 417
4.410 Quellenverzeichnis	S. 418
4.411 Anhang	S. 419
4.412 Glossar	S. 420
4.413 Index	S. 421
4.414 Bibliographie	S. 422
4.415 Literaturverzeichnis	S. 423
4.416 Quellenverzeichnis	S. 424
4.417 Anhang	S. 425
4.418 Glossar	S. 426
4.419 Index	S. 427
4.420 Bibliographie	S. 428
4.421 Literaturverzeichnis	S. 429
4.422 Quellenverzeichnis	S. 430
4.423 Anhang	S. 431
4.424 Glossar	S. 432
4.425 Index	S. 433
4.426 Bibliographie	S. 434
4.427 Literaturverzeichnis	S. 435
4.428 Quellenverzeichnis	S. 436
4.429 Anhang	S. 437
4.430 Glossar	S. 438
4.431 Index	S. 439
4.432 Bibliographie	S. 440
4.433 Literaturverzeichnis	S. 441
4.434 Quellenverzeichnis	S. 442
4.435 Anhang	S. 443
4.436 Glossar	S. 444
4.437 Index	S. 445
4.438 Bibliographie	S. 446
4.439 Literaturverzeichnis	S. 447
4.440 Quellenverzeichnis	S. 448
4.441 Anhang	S. 449
4.442 Glossar	S. 450
4.443 Index	

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	S. 5
Olfaktorisches System	S. 7
2-Desoxyglucose-Methode	S. 9
Zielsetzungen	S. 11
Material und Methoden	S. 12
Tiere	S. 12
Perfusion	S. 12
Histologie	S. 13
2-DG-Injektion	S. 14
Gefrierpräparation	S. 16
Autoradiographie	S. 17
Auswertung	S. 18
Rekonstruktion	S. 20
Ergebnisse	S. 21
Entwicklung des Bulbus olfactorius beim	
5 Tage alten Kaninchen	S. 21
Modifikationen der 2-DG-Methode	S. 26
2-DG-Aktivitätsmuster	S. 33
Diskussion	S. 39
Zusammenfassung	S. 46
Summary	S. 47
Literaturverzeichnis	S. 48

Anhang

S. 56

Danksagung

S. 63

Lebenslauf

S. 64

Einleitung

Nesthocker benötigen in der Regel ein ausgeprägtes Brutpflegeverhalten der Elterntiere. Katzen (Schneirla et al., 1973), Hunde (Rheingold, 1963) und Ratten (Grotta und Adler, 1969) z.B. verbringen bis zu 80% der ersten Tage nach der Geburt mit Brutpflege und Säugen. Eine Ausnahme jedoch stellen Kaninchen dar, da Kaninchenmütter ihre Jungen sofort nach der Geburt verlassen und nur alle 24 Stunden zu ihnen zurückkehren, um sie zu säugen (Venge, 1963; Zarrow et al., 1965). Die Säugezeit selbst ist extrem kurz und beträgt pro Tag etwa 2-4 Minuten (Deutsch, 1957; Lincoln, 1974). Während des Säugens stehen sie regungslos über ihren Jungen (Hudson und Distel, 1982), die ohne Hilfe die Zitzen finden müssen, obwohl die Augen noch geschlossen sind.

Untersuchungen des Zitzensuch- und Saugverhaltens neugeborener Kaninchen zeigten (Schley, 1981; Hudson und Distel, 1983), daß ein Duftstoff bzw. Pheromon, der von der Bauchhaut und insbesondere der Zitzenregion der Mutter ausgeht, für das Auffinden und Ergreifen der Zitzen entscheidend ist. Dies bedeutet wiederum, daß die Jungen von Geburt an auf ihren Geruchssinn angewiesen sind.

Auch bei neugeborenen Ratten (Alberts, 1978) und Katzen (Rosenblatt und Siegel, 1981) erfolgt die Orientierung zur Mutter und das Erkennen des Nestes mit Hilfe des Geruchssinnes. Auch bei diesen Tierarten spielen Geruchsreize für die Lokalisation der Zitzen die entscheidende Rolle (Blass und Teicher, 1980; Shuleikina-Turpaeva, im Druck). Dennoch ist überraschend wenig, im Vergleich zum visuellen System, zur Entwicklung und Funktion des olfaktorischen Systems bekannt (Moulton, 1978), obwohl die Anatomie, zumindest beim erwachsenen Tier, sehr gründlich untersucht und beschrieben worden ist (Cajal, 1911; Allison und Warwick, 1949).

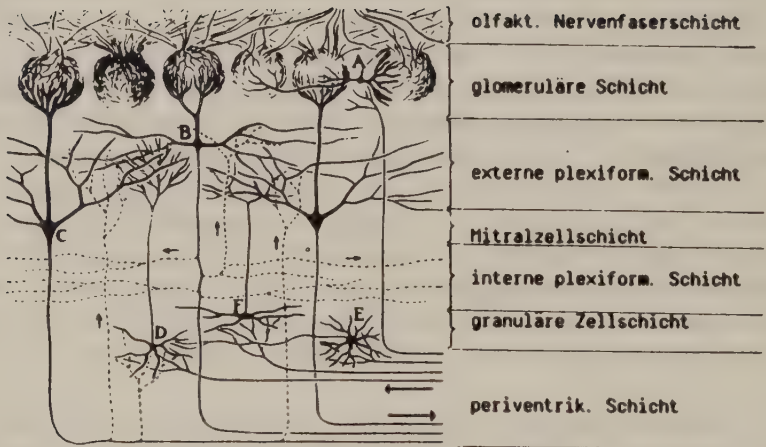


Abb. 1: Diagramm der Schichten und Verschaltungen im Bulbus olfactorius nach Cajal (aus Lohman und Lammers, 1967).
 A: externe granuläre Zellen oder periglomeruläre Zellen,
 B: Pinselzellen, C: Mitralzellen, D: granuläre Zellen,
 E: Golgi-Zellen, F: Cajal-Zellen und horizontale fusiforme Zellen. Die Kollateralen der Mitral- und Pinselzellaxone sind gestrichelt dargestellt.

Olfaktorisches System

Die olfaktorischen Rezeptoren finden sich im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle und sind, wie die Rezeptorzellen in der Retina, bipolare Ganglienzellen. Die Axone dieser primären Sinneszellen bilden zusammen den Nervus olfactorius, der durch das Siebbein zum Bulbus olfactorius des Gehirns gelangt. Dieser besteht aus mehreren Schichten, die konzentrisch um den lateralen Ventrikel gelagert sind. Es werden folgende Schichten unterschieden (Lohman und Lammers, 1967; vgl. auch Abb. 1, 4 und 5):

1. Die Schicht der olfaktorischen Nervenfasern, Fila olfactorii, die aus unmyelinisierten Axonen der Rezeptorzellen des olfaktorischen Epithels besteht.
2. Die glomeruläre Schicht, die von den Glomeruli und periglomerulären Zellen gebildet wird.
3. Die externe plexiforme Schicht, in der sich viele Dendriten aber nur wenige Zellkörper finden.
4. Die Mitralzellschicht, die aus eng gepackten granulären Zellen besteht, in der die sehr großen Mitralzellen eingelagert sind.
5. Die interne plexiforme Schicht, eine schmale Schicht weißer Substanz.
6. Die granuläre Zellschicht, die aus mehreren Reihen eng gepackter Schollen granulärer Zellen besteht, die untereinander durch Nervenfaserbündel getrennt sind.
7. Die periventrikuläre Schicht, in der die afferenten und efferenten Axone des Tractus olfactorius verlaufen.

Als erste Schaltstation der Riechbahn kommt dem Bulbus olfactorius besondere Bedeutung zu, da hier eine starke Konzentration olfaktorischer Afferenzen, und damit olfaktorischer Reize, stattfindet. Bei erwachsenen Kaninchen z.B. treten in jedem der 19 000 Glomeruli eines Bulbus die axonalen Endigungen von etwa 26 000 Rezeptorzellen mit den Dendriten von 68 periglo-

merulären Zellen (insgesamt 130 000) und 24 Mitralzellen (insgesamt 45 000) in Verbindung (Allison und Warwick, 1949) . Die Mitralzellen bilden dann das 2. Neuron der Riechbahn, dessen Axone über den Tractus olfactorius zu den nachgeschalteten Zentren des limbischen Systems, z.B. Cortex piriformis und Corpora amygdala ziehen (Abb. 1, Lohmann und Lammers, 1967).

Neben dem Hauptbulbus wird noch ein Bulbus olfactorius accessorius unterschieden. Er liegt dorso-caudal im Hauptbulbus und weist ebenfalls einen schichtenweisen Aufbau auf, der jedoch im Nisslbild nicht so klar hervortritt wie beim Hauptbulbus (vgl. Abb. 4). Es gibt Hinweise, daß hier schon vor der Geburt sensorische Aktivitäten stattfinden (Pedersen et al., 1986) und daß er im erwachsenen Tier an der Wahrnehmung von Sexual-Pheromonen beteiligt ist (Meredith, 1983; Wysocki, 1978).

Es ist von Untersuchungen an Ratten bekannt, daß ein post-nataler Reifungsprozess des olfaktorischen Systems stattfindet. Bei Geburt sind die Glomeruli des Bulbus - bis auf den sog. modifizierten glomerulären Komplex - noch nicht ausgebildet und erst ab dem dritten Tag werden sie durch das Auftreten periglomerulärer Zellen erkennbar. Eine genauere Abgrenzung ist aber erst ab dem sechsten Tag möglich (Greer et al., 1982). In den folgenden Wochen findet dann eine deutliche Zunahme der Zahl und Größe der Glomeruli statt (Pedersen et al., 1986).

Ähnlich genaue Untersuchungen liegen für das Kaninchen nicht vor. Erste Ergebnisse von Meisami et al. (1986) zeigen zwar, daß sich die Zahl der Glomeruli beim neugeborenen Kaninchen bis zum 30. Tag verdoppelt, während die Zahl der Mitralzellen unverändert bleibt, detailliertere Angaben liegen jedoch noch nicht vor, insbesondere fehlen Aussagen über den Reifegrad des Bulbus von 5 Tage alten Kaninchen.

2-Desoxyglucose-Methode

Eine vergleichsweise junge Methode funktionelle Vorgänge im Gehirn anatomisch darzustellen ist die sogenannte 2-Desoxyglucose-Methode (im Folgenden als 2-DG-Methode bezeichnet). Sie wurde von Kennedy et al. (1975) und Sokoloff (1977) an Ratten entwickelt und ermöglicht es, den In-vivo-Glucoseverbrauch von Gehirnstrukturen post mortem autoradiographisch darzustellen. Es zeigte sich, daß diese Methode sehr gut geeignet ist, lokale Aktivierung von Gehirnarealen durch äußere Reize nachzuweisen (Gallistel et al., 1977; Hubel und Wiesel, 1977; Jarvis et al., 1978). Insbesondere führen Geruchsreize zu einer spezifischen Aktivierung des olfaktorischen Systems bzw. des Bulbus olfactorius (Stewart et al., 1979).

Der cerebrale Glucosemetabolismus gilt wegen der engen Verbindung des ZNS-Stoffwechsels - der nahezu ausschließlich von Glucose abhängt - mit der neuronalen Funktion als Parameter der cerebralen Aktivität. Zur Untersuchung dieser Aktivität wird ein Analog der Glucose, die 2-Desoxy-D-Glucose (2-DG) intracardial (Teicher et al., 1980), intravenös (Sokoloff et al., 1977) oder intraperitoneal (Benson et al., 1985) injiziert. Die 2-DG wird im Blut wie Glucose transportiert und vom ZNS, wie auch von anderen Geweben, aufgenommen. Wenn die 2-DG das ZNS erreicht hat, konkurriert sie mit Glucose um das Enzym Hexokinase, welches sie zu 2-DG-Phosphat bzw. Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Auf dieser Stufe verhindert die veränderte Struktur der 2-DG die Umwandlung des 2-DG-Phosphats zu Fructose-6-Phosphat durch das Enzym Phosphohexoisomerase, welches die Voraussetzung für die Fortsetzung der Glycolyse darstellt. Dies hat zur Folge, daß es abhängig von der Aktivität des Gehirns und der damit verbundenen Aufnahme von 2-DG zu einer Anreicherung von 2-DG-Phosphat in den funktionell aktiven Arealen des Gehirns kommt. In pharmakologisch wirksamen Dosen würde dies zur Hypoglykämie und zur Bewußtlosigkeit führen.

Die in der 2-DG-Methode verwendete Dosierung hat jedoch keinen entscheidenden Effekt auf den ZNS-Stoffwechsel (Sokoloff et al., 1977).

Wird radioaktiv markierte 2-DG, in der einzelne Kohlenstoff- oder Wasserstoffatome durch radioaktives ^{14}C oder Tritium substituiert wurden, verwendet, so kann die Anhäufung des 2-DG-Phosphates mit Hilfe der Autoradiographie bildlich dargestellt werden. In der Autoradiographie wird ein Film oder eine photographische Emulsion durch die energiereiche Strahlung der radioaktiven Atome geschwärzt, wobei es zu einer unterschiedlich starken Verteilung von Silberkörnern kommt, d.h. je stärker die Konzentration von radioaktiven Atomen ist, desto intensiver ist die Schwärzung des Filmes.

Mit Hilfe 2-DG-Autoradiographie kann man einer anatomischen Betrachtung des olfaktorischen Systems eine funktionelle Betrachtung gegenüberstellen. Ihre Anwendung nach Geruchsstimulierung bei erwachsenen Ratten zeigte punktförmige Zentren erhöhter Glucoseaufnahme im Bulbus olfactorius (Sharp et al., 1975; Sharp et al., 1977; Stewart et al., 1979). Diese Zentren ließen sich histologisch den Glomeruli des Bulbus zuordnen und stellen somit die funktionsspezifische Verteilung der Rezeptorzellen, die durch einen Geruch stimuliert werden, auf glomerulärer Ebene dar (Greer et al., 1981). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese topographische Verteilung aktiver Glomeruli variiert, wenn man Muster vergleicht, die nach einer Stimulierung mit dem Geruch von Amylacetat, Kampfer, geruchsfreier Luft oder Raumluft entstehen (Astic und Saucier, 1982; Jourdan et al., 1980). Auch bei neugeborenen Ratten konnten mit der 2-DG-Methode Änderungen der Aktivität des olfaktorischen Systems nach Darbietung künstlicher und natürlicher Gerüche nachgewiesen werden (Teicher et al., 1980; Astic und Saucier, 1981).

Zielsetzung

Neugeborene Kaninchen dürften sich besonders gut als Modell für Untersuchungen zur Entwicklung und Funktion des olfaktorischen Systems eignen (Hudson und Distel, im Druck), da

1. der Geruchssinn für sie in den ersten Lebenstagen von entscheidender Bedeutung ist, um auf das vom Bauch der Mutter ausgehende Pheromon mit Zitzensuch-Verhalten schnell und zielsicher zu reagieren (Hudson und Distel, 1983, 1984; Distel und Hudson, 1984, 1985) und
2. da sie schon am ersten Tag lernen können, auf einen beliebigen, künstlichen Geruch mit Suchverhalten zu reagieren, wenn sie diesen während des Säugens an der Mutter wahrgenommen haben (Hudson, 1985).

In dieser Arbeit soll geprüft werden, welche Modifikation der relativ schwierigen 2-DG-Methode (Sokoloff et al., 1977; Stryker, 1978; Hand, 1982; Bell und Mellor, 1984; Benson et al., 1984) sich bei neugeborenen Kaninchen zur Untersuchung olfaktorischer Funktionen eignet und insbesondere, welche Muster im Bulbus olfactorius, nach 2-DG-Injektion, auf Grund einer Stimulierung durch das Zitzensuchpheromon entstehen.

Da die Reaktion auf das Zitzensuchpheromon am besten bei 5 Tage alten Kaninchen ausgeprägt ist (Distel und Hudson, 1983), werden Tiere dieser Altersgruppe für die Untersuchungen verwendet. Da aber über den Reifegrad des Bulbus olfactorius dieser Altersgruppe noch wenig bekannt ist (Meisami et al., 1986), sollen zunächst mit Hilfe einer histologischen Voruntersuchung Aussagen über die Entwicklung des Bulbus olfactorius bei 5 Tage alten Kaninchen im Vergleich zum neugeborenen und adulten Tier gemacht werden.

Material und Methoden

Tiere

Die Kaninchen stammen aus einem etablierten Chinchilla-Stamm (Chbb) der Firma Thomae, Biberach und wurden in den Versuchstieranlagen des Instituts für Medizinische Psychologie, München, gezüchtet. Für die neuroanatomischen Voruntersuchungen wurden 4 ein Tag alte Tiere (Gewicht: 40-48 g, aus zwei Würfen), 2 fünf Tage alte Tiere (85 und 90 g, aus einem Wurf) und ein erwachsenes Tier (3,5 kg) verwendet. Zur Durchführung der 2-DG-Markierungsversuche wurden 20 Kaninchen im Alter von 5 Tagen (60-100g, aus sieben Würfen) verwendet.

Perfusion

Für die histologische Untersuchung des Bulbus olfactorius war es notwendig, die Tiere zu perfundieren, um optimal fixiertes Gewebe zu erhalten. Dazu wurden sie vor der Perfusion mit Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Parke-Davis, 15-25mg/kg Körpergewicht) und Xylacin (Rompun[®], Bayer, 3-5mg/kg Körpergewicht) in einer Mischspritze intramuskulär narkotisiert. Dann wurde der Thorax eröffnet, eine Perfusionskanüle durch die Herzspitze in die linke Herzkammer eingeführt und das rechte Herzohr wurde mit einem Schnitt eröffnet. Beim erwachsenen Tier wurde zusätzlich die Aorta abdominalis mit einer Gefäßklemme abgeklemmt, um eine bessere Perfusion der Kopfregion zu erhalten.

Die Perfusion erfolgte zunächst mit isotonischer Kochsalzlösung, um das Blut auszuwaschen (circa 50 ml bei den jungen und 200 ml beim erwachsenen Tier). Anschließend wurde zur Fixation des Gewebes mit einer Mischung aus Glutar- und Formaldehydlösung (Jacobson und Trojanowski, 1974; Rezept siehe Anhang) durchspült (circa 250 ml bei den jungen und 1000 ml beim erwachsenen Tier).

Zur Vermeidung von Kristallbildung, die beim Gefrieren zu Artefakten führt, wurde schließlich mit einer 10 % Saccharoselösung in Phosphatpuffer (Rezept siehe Anhang) nachgespült.

Histologie

Die Schädelkapsel der fixierten Tiere wurde vorsichtig eröffnet und die Bulbi olfactorii, sowie Teile des Vorderhirns freipräpariert. Im rostralen Bereich wurde das Vorderhirn transversal durchtrennt um eine Fläche zum Auffrieren der Bulbi olfactorii auf den Objektisch des Kryostaten zu erhalten. Dann wurden die Bulbi olfactorii in Eigelb eingebettet (Ebbesson, 1970; Rezept siehe Anhang) und anschließend im Kryostaten (Frigocut 2800 E, Fa. Jung) auf der Schnellgefriereinrichtung aufgefroren. Geschnitten wurde transversal, 40µm in Serie, bei einer Kryostatenbox-Temperatur von -16 Grad C und einer Objekttemperatur von -14 Grad C. Die Schnitte wurden auf kalte gelatinisierte Objektträger gedrückt und durch Daumendruck (an der Unterseite des Objektträgers) aufgetaut.

Nach dem Trocknen bei 60 Grad C wurden alternierende Schnitte mit Thionin zur Färbung der Zellkerne und Nisslschollen (Romeis, 1968) und Cytochromoxidase zur Darstellung der Mitochondrienverteilung und -aktivität (Wong-Riley, 1979) gefärbt. Für die Silberimprägnations-Färbung zur Darstellung der Markscheiden (Gallyas, 1979) wurde ein anderer Wurf verwendet, da für diese Färbung eine reine Formolperfusion Voraussetzung ist (Rezepte siehe Anhang). Die gefärbten Schnitte wurden in 100%igem Alkohol dehydriert und anschließend mit DPX (DPX Mounting Medium, Fa. Gurr) eingedeckt.

2-DG-Injektionen

Die 2-DG-Versuche fanden immer vormittags statt. Die Tiere hatten mindestens 24 Stunden keine Nahrung aufgenommen. Die 2-DG-Injektionen wurden intracardial oder intraperitoneal mit einer 0,4 x 21 mm Einmalkanüle und einer 1 ml Einmalspritze durchgeführt. Es wurden bei jeweils 9 Tieren 30 μ Ci von ¹⁴C-markierter 2-Desoxy-D-Glucose bzw. 2-Fluoro-2-Desoxy-D-Glucose und bei 2 Tieren je 500 μ Ci von ³H-markierter 2-Desoxy-D-Glucose (Fa. Amer-sham Buchler, Braunschweig) verwendet. Während die ¹⁴C-markierte 2-DG in wässriger Lösung gebrauchsfertig war, lag die Tritium markierte 2-DG in alkoholischer Lösung vor und wurde deshalb zunächst mit Stickstoff begast, um den Alkohol zu verdampfen und anschließend mit 0,2 ml isotonischer Kochsalzlösung wieder gelöst. Zur Injektion wurde zunächst 0,05ml isotonische Kochsalzlösung und dann 0,15ml der ¹⁴C markierten 2-DG oder im Fall der Tritium markierten 2-DG 0,1ml aufgezogen und injiziert.

Als Reiz wurde die Zitzenregion eines laktierenden Kaninchens und als Kontrolle Raumluft angeboten. Das laktierende Kaninchen wurde vor Versuchsbeginn mit Ketavet[®]/Rompun[®] (i.m., Dosierung siehe oben) oder Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], 40mg/kg Kg) und Urethan (0,75g in 20%iger Lösung i.p./kg Kg) narkotisiert (Monte-ro, 1977). Zur Exposition mit Raumluft wurden die Versuchstiere in einem Glaszylinder mit 20cm Durchmesser unter eine Wärmelampe (35 Grad C) gesetzt. Die Geruchsstimulierung der Jungtiere erfolgte nach i.c. Injektion über eine Dauer von 45 Minuten und nach i.p. Injektion über 60 Minuten. Am Ende der Reizdarbietung wurden die Tiere mit T 61[®] (Hoechst, 0,5ml intrapulmonal) getötet.

Versuchsablauf

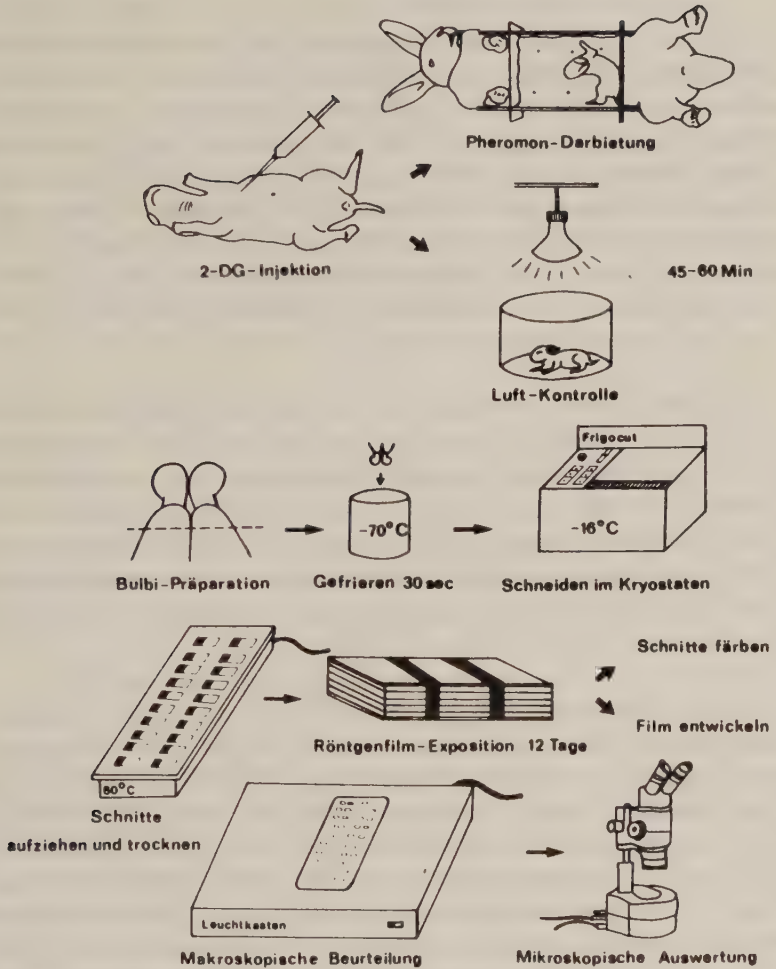


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Desoxyglucoseuntersuchungen.

Gefrierpräparation

Die Bulbi wurden entweder sofort oder nach dem 3. Versuch (Ende einer Versuchsperiode) freipräpariert und anschließend tiefgefroren. Die Entnahme erfolgte auf zwei verschiedene Arten: es wurde entweder (1) das Os frontale abgenommen und die Bulbi unter Sichtkontrolle mit den Siebbeingruben und der Siebplatte mit einer Skalpellklinge umschnitten oder (2) die Bulbi wurden aus den Siebbeingruben freipräpariert und die Nervenfasern des olfaktorischen Epithels caudal der Siebplatte durchtrennt. Die Bulbi wurden durch einen Schnitt transversal ca. 3mm im Vorderhirn abgetrennt, um eine Auflage zum Auffrieren auf den Objekthalter des Kryostaten zu haben.

Als Schnellgefriermethode wurde einerseits gasförmiges CO₂ benützt, um das Gewebe direkt auf den Objekthalter des Kryostaten aufzufrieren, andererseits eine Kältemischung, die aus Trockeneis und 100%igem Alkohol hergestellt wurde und konstant eine Temperatur von - 70 Grad C hatte. Als Gefriermedium wurde Isopentan (2-Methylbutan) verwendet. Das Isopentan wurde in einem Plastikgefäß in die Kältemischung getaucht. Sobald das Isopentan -70 Grad C erreicht hatte, war es gebrauchsfertig.

Um ein Auseinanderfallen und eine Deformation zu verhindern, wurden die freipräparierten Bulbi in einem konischen Plastikzylinder (gekürztes Eppendorfggefäß) aufgefangen und dann in dem kalten Isopentan gefroren oder mit dem Plastikzylinder direkt, ohne Isopentan, in die Kältemischung getaucht. Die Bulbi, die mit Siebplatte und Siebbeingrube präpariert worden waren, wurden freischwimmend im Isopentan gefroren. Das gefrorene Gewebe wurde anschließend in Alufolie gewickelt und im Kryostaten bei - 16 Grad C oder im Gefrierfach bei -26 Grad C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Auf eine Einbettung wurde in 5 Fällen verzichtet. Meist (in 13 Fällen) wurde jedoch eine 1,5%ige Gelatinelösung zur Einbettung verwendet. Dazu wurden die Bulbi in 6 Fällen vor dem Gefrieren in die Gelatinelösung getaucht. In einem Fall wurde nach dem Gefrieren mit Gelatinelösung überschichtet und in 6 Fällen wurden nur Problemstellen während des Schneidens mit Gelatinelösung überzogen. In je einem Fall wurde eine weitere Art der Einbettung geprüft: vor dem Gefrieren eine Schnelleinbettung mit Eigelb oder nach dem Gefrieren ein Überschichten mit Eigelb. Geschnitten wurde das Gewebe im Kryostaten (transversal, 16 μ m in Serie) und wie oben beschrieben, auf Objekträger aufgetaut.

Autoradiographie

Zur Kontaktautoradiographie wurde für das 14C-markierte Material SB-Röntgen-Film (Kodak) verwendet, für das 3H-markierte Material 3H Ultrofilm (LKB). Das Belegen der Kassetten und das Entwickeln der Filme erfolgte in absoluter Dunkelheit oder unter Rotlicht (Kodak Rotfilter für Autoradiographie).

Das Belegen der Kassetten erfolgte im Sandwich-Verfahren. Auf eine mit Schaumstoff beklebte Aluplatte (22 x 30 cm) wurden 20 Objekträger aufgelegt, auf diese wurde dann der Röntgenfilm gelegt und zwar so, daß die empfindliche Schicht direkt auf den Schnitten lag. Darauf folgte wiederum eine beidseits mit Schaumstoff beklebte Aluplatte, darauf Objekträger, Film, Schaumstoff beklebte Aluplatte usw.... Dieses Prinzip wurde über vier Schichten fortgesetzt. Die gesamte Kassette wurde mit Hilfe von vier Schrauben zusammengedrückt, so daß die Schnittoberfläche und der Röntgenfilm fest aneinander gepreßt wurden. Zum Schutz gegen seitlich einfallendes Licht wurden die Kassetten in Alufolie gewickelt und mit einem lichtdichten Leinentuch umhüllt.

Exponiert wurde bei Raumtemperatur: das 14C-markierte Mate-

rial 4, 8 oder 12 Tage, das 3H-markierte Material 20 Tage lang. Bei der Entwicklung hatten alle Lösungen Raumtemperatur. Im Entwickler (D 19, Kodak) verblieb der Film 2 1/2 Minuten, im Stoppbad (Indicet, Tetenal) 1 Minute und im Fixierbad (Röntogen, Tetenal) 5 Minuten. Anschließend wurde in Leitungswasser gewässert, vor dem Trocknen wurden die Filme mit Aqua dest. gespült. Wenn die Autoradiogramme zu schwach erschienen, wurden die Schnitte für eine weitere Exposition verwendet, bevor sie zur genauen Auswertung mit Thionin gefärbt wurden.

Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden im Lichtmikroskop (Leitz Dialux 20) bei 24-facher Vergrößerung in Hinblick auf die Ausbildung der verschiedenen Schichten und Strukturen des Bulbus olfactorius überprüft. Die Mikrophotographien wurden mit einem Photomakroskop (Wild) aufgenommen.

Die Beurteilung der Autoradiogramme erfolgte zunächst makroskopisch auf einem Leuchtkasten. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit den Autoradiogrammen unter einem Stereo-Mikroskop (Wild) bei 12-facher Vergrößerung verglichen und mit Hilfe eines Zeichenspiegels gezeichnet. Um das Autoradiogramm unter dem Mikroskop betrachten zu können, wurde der Röntgenfilm entsprechend den Objektträgern zugeschnitten.

Von jedem Objektträger (mit je 7 Schnitten) wurde ein repräsentativer Schnitt unter besonderer Berücksichtigung der glomerulären Schicht gezeichnet. Anschließend wurde das korrespondierende Autoradiogramm mit gleicher Vergrößerung gezeichnet. Darin wurden jene Stellen als besondere Schwärzung durch Silberkornverdichtung angesprochen, die (1) mit dem Auge erkennbar dunkler als die Umgebung waren, (2) in einem benachbarten Schnitt an der gleichen Stelle zu erkennen waren und (3) nicht als Artefakte

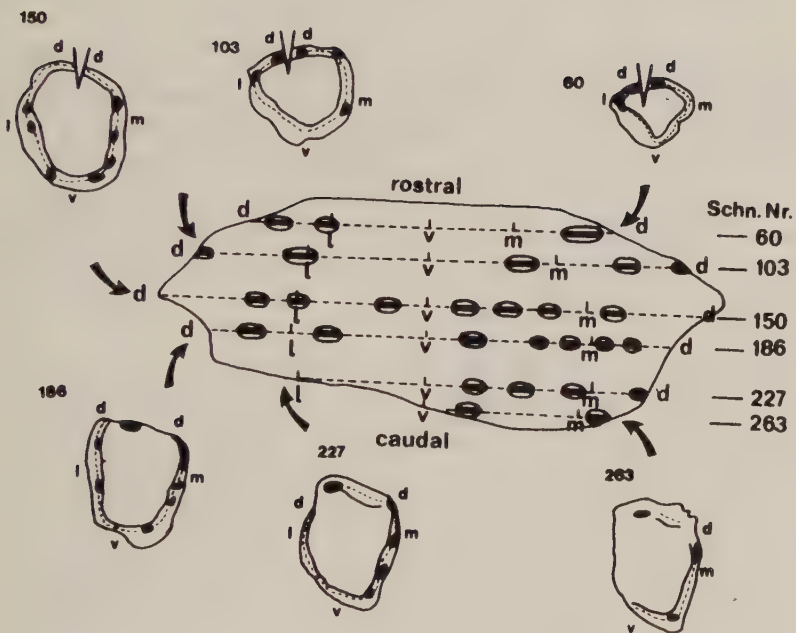


Abb. 3: Schematische Darstellung des Rekonstruktionsweges der kartographischen Abbildung im Fall 1, linker Bulbus.
d: dorsal, l: lateral, v: ventral, m: medial.

ausgeschlossen werden konnten. Die Zeichnungen der Nisslbilder und der entsprechenden Autoradiogramme wurden genau übereinandergelegt, um die Lage der glomeruläre Schicht mit den entsprechenden Schwärzungen in eine halbschematische, dritte Zeichnung zu übertragen (vgl. Abb. 3 und 8).

Rekonstruktion

Zur Rekonstruktion (Abb. 3) der glomerulären Schicht des gesamten Bulbus wurden dann diese halbschematischen Zeichnungen verwendet. Um einen für alle Zeichnungen gültigen Fixpunkt zu erhalten, wurde der Mittelpunkt eines in der Mitte des Bulbus gelegenen Schnittes geometrisch bestimmt und als Zentrum eines Kreuzes verwendet, welches den Bulbus in vier Quadranten teilt; diese Quadranten wurden anschließend auf die anderen Zeichnungen des Bulbus übertragen.

Der ventrale Schnittpunkt dieses Kreuzes und der glomerulären Zone wurden als Mittelpunkt einer Strecke gewählt, deren Länge dem Umfang des durch die Glomeruli gebildeten Kreises bzw. Teilkreises entsprach und deren beiden Endpunkte den dorsalen Schnittpunkt der glomerulären Zone und des Kreuzes repräsentierten. Auf dieser Strecke wurden nun die Silberkornverdichtungen, die lateralen und medialen Schnittpunkte des Kreuzes lokalisationsgerecht eingetragen. Die so entstandenen aufgerollten Abbildungen der glomerulären Schicht wurden in Serie hintereinander gezeichnet, der Abstand der verschiedenen Schnitte zueinander war proportional der Vergrößerung der glomerulären Zone. So entstand eine kartographische Abbildung der glomerulären Schicht eines Bulbus, in welcher die Schwärzungen der Autoradiogramme eingetragen waren. Bereiche, in denen in aufeinanderfolgenden Schnitten direkt benachbart Schwärzungen auftraten, wurden zu gemeinsamen Feldern verbunden.

Ergebnisse

Entwicklung des Bulbus olfactorius beim 5 Tage alten Kaninchen

Bereits der makroskopische Vergleich zeigte eine erhebliche Größenzunahme der Bulbi olfactorii der 5-Tage-Tiere gegenüber den Bulbi der 1 Tag alten Tiere. So nahm die mittlere Länge der Bulbi von 3 mm auf etwa 4,5 mm zu und der Durchmesser - in Höhe des Bulbus olfactorius accessorius - von etwa 2,5 mm auf 3,1 mm. Beim erwachsenen Kaninchen betrug der Abstand vom rostralen Pol der Bulbi bis zum rostralen Pol des Vorderhirnes circa 10 mm und der Durchmesser in Höhe des accessorischen Bulbus jeweils 4,5 mm.

Die mikroskopische Untersuchung der Nissl-, Markscheiden- und Cytochromoxidase-gefärbten Schnitte zeigte, daß im Bulbus olfactorius des 5 Tage alten Kaninchens, wie aber auch im 1 Tag alten Tier, bereits alle Schichten ausgebildet und histologisch zu differenzieren sind. In Abb. 4 ist ein Nissl-gefärbter Schnitt durch den Bulbus olfactorius eines 5 Tage alten Kaninchens einem Cytochromoxidase-gefärbten Schnitt gegenübergestellt. Beide zeigen auch den Bulbus olfactorius accessorius, auf dessen verschiedene Schichten hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Auf eine Darstellung der Markscheidenfärbung wurde verzichtet, da beim 5-Tage Tier, im Gegensatz zum adulten Tier, noch keine markhaltigen Fasern im Tractus olfactorius gefunden wurden.

Im Nisslbild stellt sich die außen liegende Schicht der Filia olfactorii hell dar, während sie im Cytochromoxidasebild (CO-Bild) besonders durch die Fasciculation der Nerven deutlich wird. Die darauf folgende glomeruläre Schicht erscheint im CO-Bild nahezu wie ein Negativ des Nisslbildes. Hier treten die runden Strukturen der Glomeruli dunkel hervor, während sie sich im Nisslbild vom Band der periglomerulären Zellen als helle Aussparungen abheben. Interessanterweise sind die Glomeruli von

A



B



1mm

Abb. 4: Photographische Darstellung histologischer Schnitte durch den Bulbus olfactorius eines 5 Tage alten Kaninchens in Höhe des Bulbus olfactorius accessorius (Pfeil):
(A) Nissl-Färbung,
(B) Cytochromoxidase-Färbung.

sehr unterschiedlicher Größe und wie bei höherer Vergrößerung zu erkennen war, häufig auch unterschiedlich stark Cytochromoxidase-aktiv.

In zentraler Richtung wird diese Schicht im Nisslbild (Abb. 4A) von einer helleren Zone, der externen plexiformen Schicht abgegrenzt. An diese schließt sich, als käftiger dunkler Streifen im Bild zu erkennen, die Mitralzellschicht an. Etwas abgesetzt von der Mitralzellschicht beginnen die Schollen der granulären Zellschicht, die zur Mitte hin immer kleiner werden und sich schließlich auflösen, bevor sie die dunklere periventrikuläre Schicht erreichen. Zwischen der Mitralzellschicht und der granulären Zellschicht liegt die schmale, interne plexiforme Schicht.

Im CO-Bild (Abb. 4B) erscheinen die externe plexiforme Schicht und die Mitralzellschicht als ein einziger dunkler Streifen, während die granuläre Schicht sich deutlich in zwei verschieden graue Zonen teilt. Auch ist hier die periventrikuläre Schicht als helle Zone um die Ventrikelöffnung besonders gut zu unterscheiden.

Ein näherer Vergleich der Bulbi der neugeborenen und 5 Tage alten Kaninchen untereinander und mit dem erwachsenen Tier zeigte einige charakteristische Unterschiede in der jeweiligen Entwicklung dieser Schichten (vgl. Abb. 5):

- (1) Die Schicht der olfaktorischen Nervenfasern war bei den jungen Tieren wesentlich dünner als beim erwachsenen Kaninchen.
- (2) In der glomerulären Schicht der 5 Tage alten Tiere erschienen die Glomeruli dichter gereiht und deutlicher durch periglomeruläre Zellen abgegrenzt als bei den neugeborenen Kaninchen. Im Gegensatz zum erwachsenen Tier nahmen die periglomerulären Zellen noch einen großen Teil der glomerulären Schicht ein. Beim erwachsenen Tier hatten alle Glomeruli in etwa die gleiche Größe und erschienen durch periglomeruläre Zellen

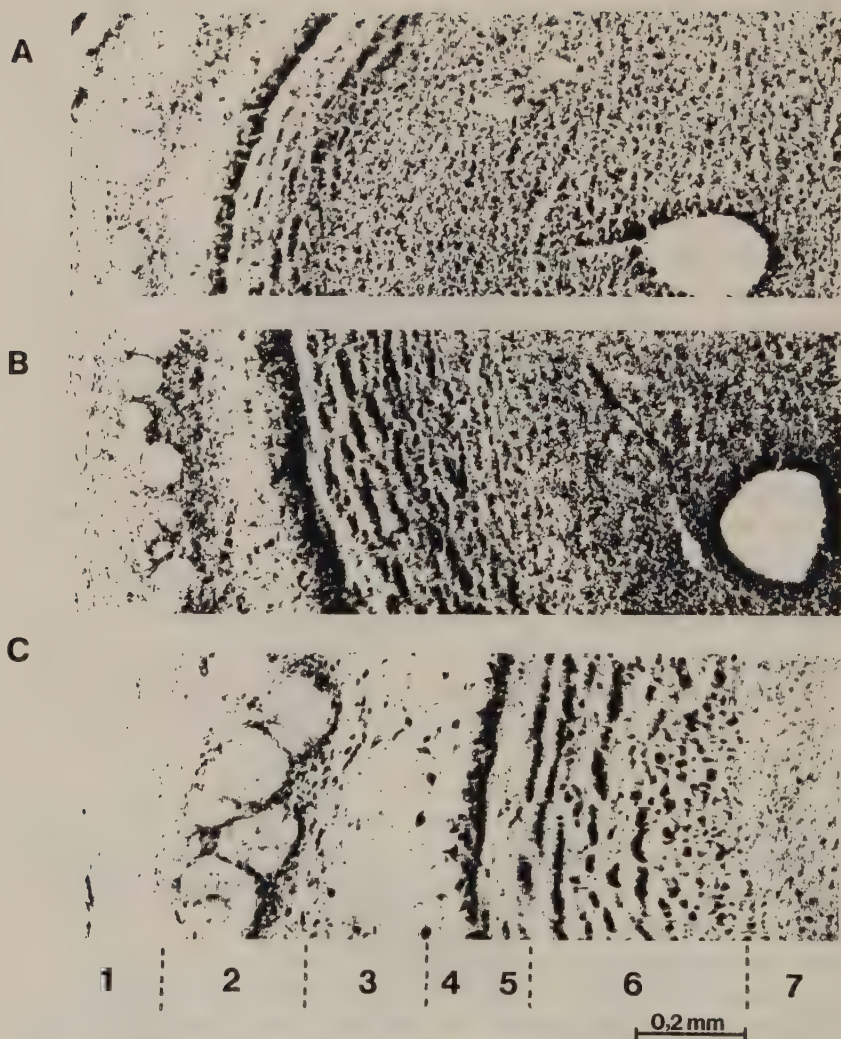


Abb. 5: Entwicklung der Schichten im Bulbus olfactorius eines 1 Tag alten Kaninchens (A), eines 5 Tage alten (B) und eines erwachsenen Kaninchens (C).

1 = Nervenfaserschicht, 2 = glomeruläre Schicht,
 3 = externe plexiforme Schicht, 4 = Mitralzell-Schicht,
 5 = interne plexiforme Schicht, 6 = granuläre Zellschicht, 7 = periventriculäre Schicht.

stärker strukturiert. Der relative Anteil der periglomerulären Zellen wurde geringer.

- (3) Am deutlichsten nahm die externe plexiforme Schicht mit zunehmendem Alter an Umfang zu. Beim 1 Tag alten Tier handelte es sich noch um einen schmalen Streifen, in dem wenige Zellen vorhanden waren. Beim 5 Tage alten Tier nahm die Zelldichte bereits ab und die Schicht dehnte sich weiter aus. Das erwachsene Tier zeigte schließlich die größte Ausdehnung zwischen glomerulärer Schicht und Mitralzellschicht, in welcher nun auch große, ektopische Mitralzellen zu erkennen waren.
- (4) Im Vergleich der drei Altersgruppen hatte das 5 Tage alte Tier die ausgeprägteste Mitralzellschicht. Während beim neugeborenen Tier die Zahl der eingelagerten granulären Zellen geringer schien, war die Mitralzellschicht beim erwachsenen Kaninchen gestreckt und dünner. Außerdem entstand der Eindruck, daß die Zellen lockerer zusammenliegen als bei den jüngeren Tieren.
- (5) Bei der internen plexiformen Schicht waren kaum deutliche Altersunterschiede erkennbar, außer daß sie bei den jüngeren Tieren durch die kompaktere Mitralzellschicht etwas deutlicher hervortrat.
- (6) In der Ausbildung der granulären Zellschicht waren erhebliche Altersunterschiede zu erkennen. So war bei den 1 Tag alten Tieren eine Schollenbildung nur ansatzweise vorhanden, während sie bei den 5 Tage alten Kaninchen erheblich vorangeschritten und durch eine hellere Überganszone von der periventrikulären Schicht getrennt war. Im adulten Tier schließlich erstreckten sich die Schollen fast bis zur periventrikulären Schicht und hatten auch insgesamt an Größe zugenommen.
- (7) Die periventrikuläre Schicht schließlich war bei den Jungtieren noch dicht mit Zellkörpern bepackt, während sie beim erwachsenen Kaninchen locker strukturiert erschien und das für das Marklager typische Gliazellbild aufwies.

Modifikationen der 2-DG-Methode

In einem optimalen Autoradiogramm (Abb. 6A links) erschienen die mit ^{14}C -Desoxyglucose markierten Bulbi als zwei dunkle, unscharf begrenzte Ovale, die durch eine hellere Zone voneinander getrennt waren. Durch ihre interne Struktur waren sie von umliegendem Gewebe, soweit es ebenfalls herauspräpariert und geschnitten worden war, gut zu unterscheiden. Innerhalb der Bulbi ließen sich im allgemeinen drei verschiedene Schwärzungszonen erkennen: ein heller Kern, von einem dunkleren Ring umgeben und ein heller Randbereich. Wesentlich für die Beurteilung der reizspezifischen Aktivität waren punktförmige Verdichtungen der Silberkörner, die typischerweise am äußeren Rand des dunklen Ringes auftraten, da diese gleichbedeutend mit besonders hoher Radioaktivität, d.h. einem lokal erhöhten Glucosebedarf waren.

Eine exakte Zuordnung der Schwärzungszonen und punktförmigen Verdichtungen zu den Schichten des Bulbus olfactorius, war aber erst durch einen genauen Vergleich mit dem Nisslbild (Abb. 6A rechts) möglich. Hier zeigte sich, daß der helle Kern der periventriculären Schicht entsprach, der Randbereich mit der Schicht der olfaktorische Nervenfasern und der dazwischenliegende, dunklere Ring mit den übrigen Schichten korrelierte. Durch ein Übereinanderlegen von Schnitt und Autoradiogramm ließ sich schließlich feststellen, daß die Zentren der Silberkornverdichtungen genau mit der glomerulären Schicht übereinstimmten.

Alle drei verwendeten 2-DG-Arten lieferten ausreichend gute Autoradiogramme. Zwischen den Autoradiogrammen von ^{14}C markierter 2-Desoxy-2-Glucose und ^{14}C markierter 2-Fluoro-2-Desoxyglucose waren keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Autoradiogramme der mit Tritium markierten 2-DG-Bulbi (Abb. 6B) zeigten jedoch eine wesentlich feinere Körnung, was zu einer scharf begrenzten Darstellung der Schnittgrenzen beitrug. Die für ^{14}C -

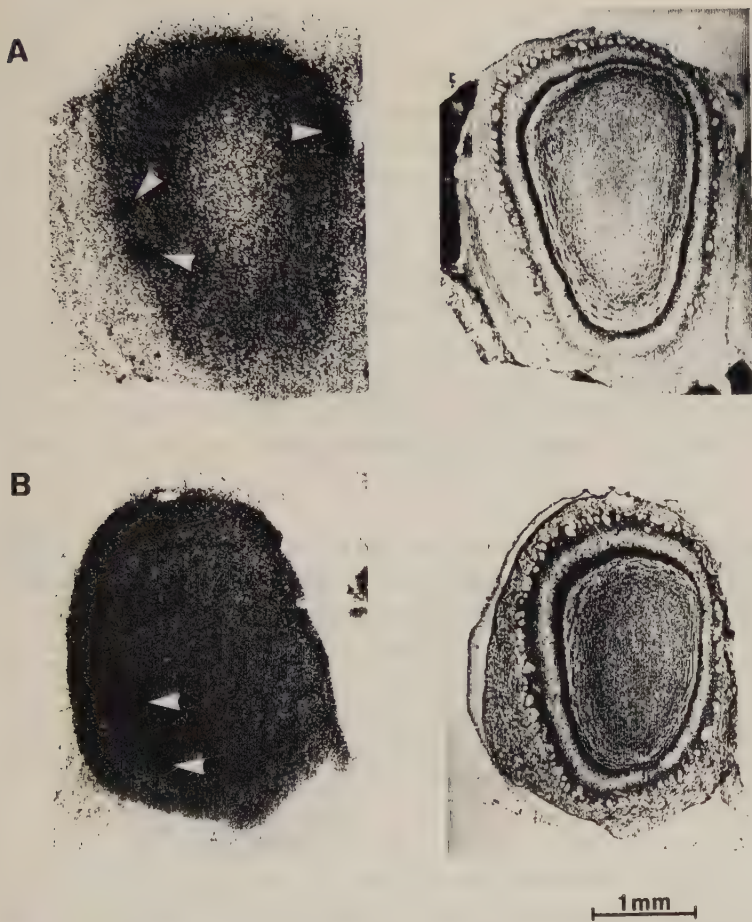


Abb. 6: Photographische Darstellung von Autoradiogrammen (links) und korrespondierenden Nisslbildern (rechts) des Bulbus olfactorius von 5 Tage alten Kaninchen. Pfeile deuten auf Aktivitätszentren in der glomerulären Schicht.
 (A) nach Injektion mit ^{14}C -markierter Desoxyglucose,
 (B) nach Injektion mit ^3H -markierter Desoxyglucose.

Autoradiogramme charakteristische interne Struktur fehlte jedoch weitgehend und die Zentren erhöhter 2-DG-Aktivität waren häufig nur undeutlich ausgeprägt. Aus diesem Grund und wegen des vergleichsweise höheren Arbeitsaufwandes wurde auf weitere Versuche mit Tritium markierter 2-DG verzichtet.

Obwohl die Tiere nach intracardialer 2-DG-Injektion zwar kein Schmerzverhalten, aber in vier Fällen eine Dämpfung ihrer Verhaltensaktivität zeigten, waren in den Autoradiogrammen keine auf die Injektionsmethode zurückzuführenden Unterschiede zu erkennen. Dennoch wurden die letzten Versuche mit i.p. Injektionen durchgeführt, die ebenfalls zu befriedigenden Ergebnissen führten.

Die meisten methodischen Modifikationen waren notwendig, um Artefaktbildungen (Abb. 7a und b) zu verhindern, die die Interpretation des Autoradiogrammes erschwerten oder unmöglich machten. So trat in den Fällen, in denen eine größere Zeitspanne (10-20 min) zwischen dem Töten und dem Tieffrieren des Gewebes lag, ein Verwaschen (Diffusion, Abb. 7A) der Aktivitätszentren im Autoradiogramm auf. Dagegen verschwand dieser Effekt, wenn die Bulbi rasch mit dem umliegenden Gewebe entnommen und sofort tiefgefroren wurden.

Auch wurde weiterhin, um Diffusion des wasserlöslichen 2-DG-Phosphats zu vermeiden, auf eine Perfusion verzichtet und das Gewebe sofort tiefgefroren. Dabei traten zwei Formen von Gefrierartefakten auf: wurde es zu langsam gefroren, so kam es zur Eiskristallbildung und dadurch zur Zerstörung von Zellen; beim Schnellgefrieren entstanden jedoch, auf Grund des unterschiedlichen Wassergehaltes des Gewebes, häufig Sprünge im Gewebe oder es kam sogar zur Absprengung von Gewebsstücken. Dennoch konnte dies in Kauf genommen werden, da die histologische Beurteilbarkeit des Gewebes größtenteils erhalten blieb.

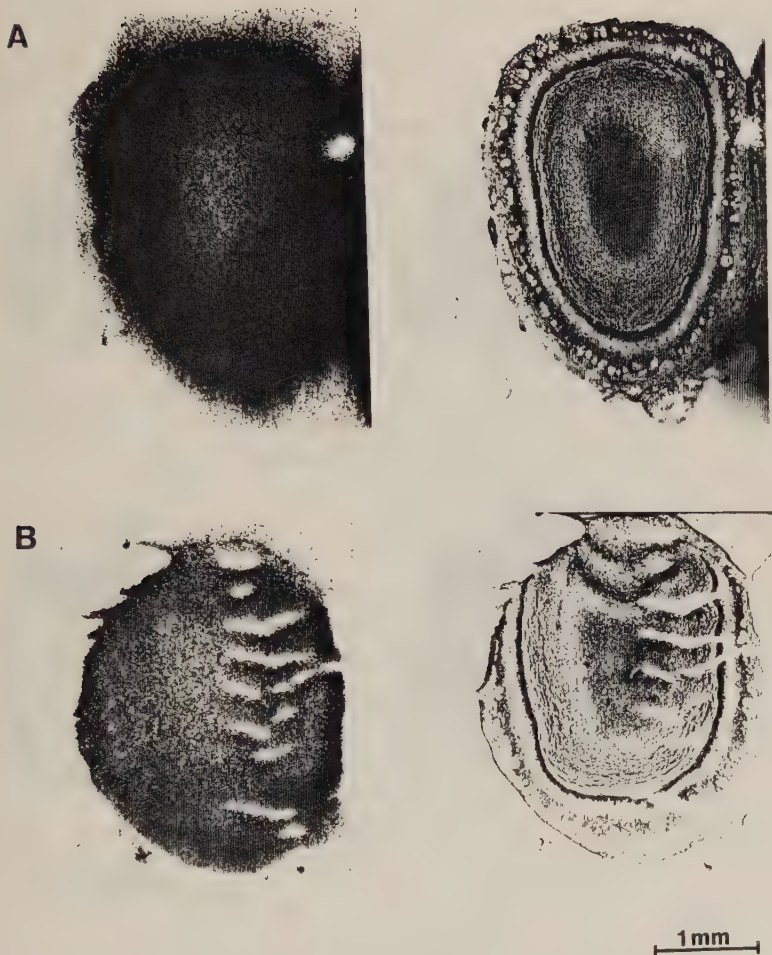
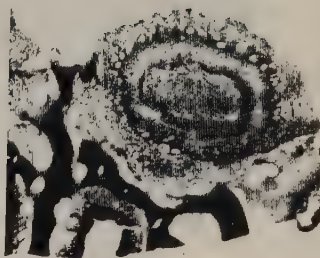


Abb. 7a: Photographische Darstellung von Artefakten in ^{14}C -Autoradiogrammen (links) mit dazugehörigen Nisslbildern (rechts):

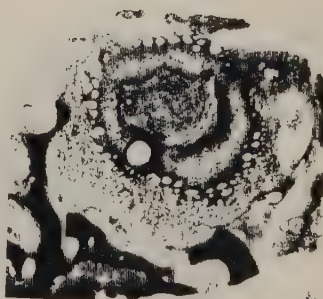
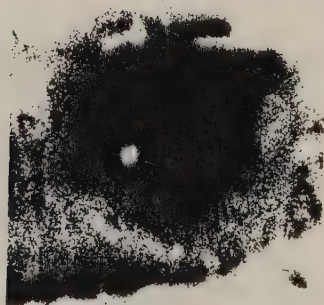
(A) Abbildung eines Diffusionsartefakts.

(B) Abbildung eines Schneideartefakts,

C



D



1mm

Abb. 7b: Photographische Darstellung von Artefakten in ^{14}C -Autoradiogrammen (links) mit dazugehörigen Nisslbildern (rechts):

(C) Abbildung einer Stauchungszone.

(D) Abbildung einer Luftblase,

Um günstigere Schneideigenschaften zu erreichen und Schneideartefakte zu vermeiden, wurden verschiedene Einbettungsmethoden getestet. Jedoch konnten keine wesentlichen Vorteile erzielt werden, wenn das Gewebe vor dem Schnellgefrieren mit Einbettungsmedium umgeben wurde, da die zur Einbettung empfohlene Gelatine, wenn sie während des Schnellgefrierens mit der Kältemischung in Kontakt kam, selbst bei -25 Grad C keine Schnittfestigkeit erreichte. Das Übersichten des Gewebes nach dem Schnellgefrieren mit Einbettungsmedium wiederum führte an den Grenzflächen zum Auftauen und durch erneutes, langsames Gefrieren zur Kristallbildung und damit zu Gefrierartefakten. Am günstigsten war es, so wenig wie möglich Einbettungsmedium zu verwenden und nur Problemstellen, wie Ventral- und Dorsalseite des Bulbus und Risse mit einem kleinen Tropfen vorgekühlten Einbettungsmedium zu überziehen.

Eine weitere Voraussetzung für die Interpretation der Autoradiogramme war eine gute Erhaltung der histologischen Schnitte. So mußte zur Vermeidung von "shatter" (Abb. 7B) darauf geachtet werden, daß die Schneidetemperatur nicht zu tief war. Andererseits ging die Schnittfestigkeit verloren und es kam zu Faltenbildung und Stauchung (Abb. 7C), wenn die Schneidetemperatur zu hoch war. Besonders problematisch war, daß die gestauchten Schnitte im Autoradiogramm eine erhöhte Aktivität vortäuschen konnten. Dieselbe Erscheinung trat u.U. auch bei zu hoher Schneidegeschwindigkeit auf.

Mikroskopisch kleine Scharten am Messer oder am Schnittstreckerplättchen des Kryostaten führten, ebenso wie Eiskristalle oder Gewebsfragmente, zu Rissen in den Schnitten mit den entsprechenden Artefakten im Autoradiogramm. Auch konnten beim Übertragen der Schnitte auf den Objektträger, Teile der Schnitte durch elektrostatische Kräfte am Messer oder Streckerplättchen hängenbleiben, was dann zu unvollständigen Abbildungen führte.

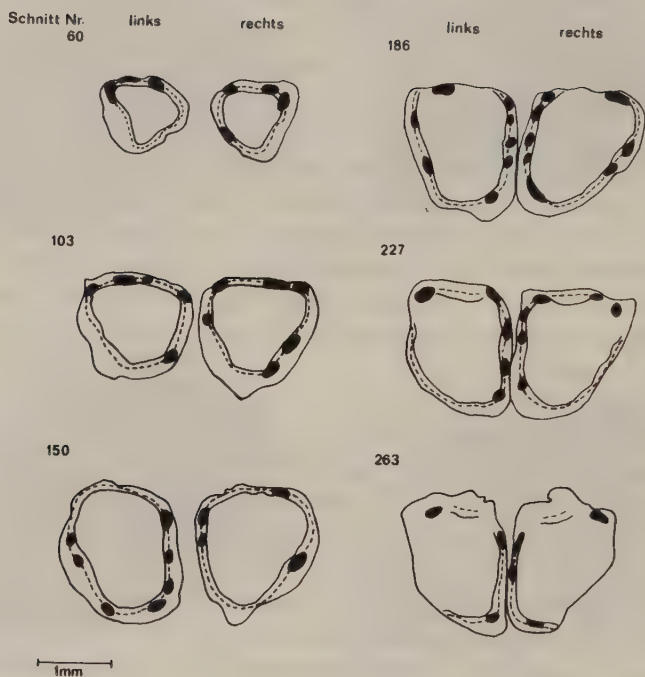


Abb. 8: Schematische Darstellung der Aktivitätszentren in einer exemplarischen Schnittfolge durch den Bulbus olfactorius (Fall 1: Pheromonstimulierung). Gestrichelte Linie: Lage der Glomeruli, durchgezogene Linie: innere Begrenzung der glomerulären Schicht, schwarze Markierungen: Aktivitätslokalisationen im Autoradiogramm.

Diese Artefakte konnten weitgehend durch die Benutzung von gelatinisierten Objektträgern vermieden werden, da die Schnitte beim Andrücken an die Objektträger besser haften blieben.

Der beste Kontrast zwischen Aktivitätszentren und normaler Gewebsaktivität im Autoradiogramm wurde mit einer Expositionszeit von 12 Tagen erreicht, die kürzeren Expositionszeiten von 4 und 8 Tagen führten zu kontrastarmen Autoradiogrammen.

2-DG-Aktivitätsmuster

An Hand des Autoradiogrammes war zwar die Beurteilung der Aktivitätszentren eines Schnittes möglich, doch war es schwierig, auf diese Weise die Aktivitätsverteilung im gesamten Bulbus olfactorius zu bewerten. Typischerweise ließen sich in benachbarten Schnitten die Aktivitätszentren an etwa der gleichen Stelle des Bulbus auffinden, doch trat mit zunehmender Entfernung häufig eine leichte Versetzung der Aktivitäten auf, so daß fraglich war, ob sich die jeweilige Aktivität in rostro-caudaler Richtung als ein Band fortsetzte oder diskontinuierliche Aktivitäten ein solches Band vortäuschten. Ein weiteres Problem stellte die große Zahl der gefundenen Aktivitäten (Abb. 8) und ihre von Fall zu Fall variable Anordnung dar. Es war daher notwendig die glomeruläre Schicht des Bulbus olfactorius seriell zu rekonstruieren und kartographisch darzustellen (vgl. Methoden).

Die serielle Rekonstruktion der glomerulären Schicht zeigte, daß die Ausdehnung und Form der Aktivitätszentren stark variieren konnten. Zum Teil setzten die Zentren sich über nicht mehr als drei Schnitte fort, so daß die Aktivität effektiv kaum mehr als einen Glomerulus umfaßte. Andere dagegen bildeten kontinuierliche Bänder oder irreguläre Felder, die eine große Zahl von Glomeruli vereinigten. Und schließlich fanden sich auch diskontinuierliche Bänder, die sich über einen größeren Bereich des Bulbus bevorzugt

in rostro-caudaler Richtung erstreckten. Ein Vergleich der glomerulären Aktivitätsmuster zeigte eine sehr große intra- und inter-individuelle Variabilität, wobei in jedem Fall jedoch die intra-individuellen Unterschiede, d.h. zwischen linkem und rechtem Bulbus, am geringsten waren und die zwischen Stimulusbedingungen am größten (vgl. Abb. 9 und 10).

In der kartographischen Darstellung der glomerulären Schicht der Bulbi olfactorii von Tieren, die dem Sitzensuch-Pheromon ausgesetzt worden waren (Abb. 9), fanden sich - besonders entlang der Ventrallinie - größere Bereiche, die frei von Aktivität waren. Ansammlungen von Aktivitätszentren dagegen fanden sich vorwiegend im latero-caudalen, medio-caudalen und medio-dorsalen Bereich des Bulbus. Individuelle Unterschiede waren besonders im dorsalen Bulbusbereich vorhanden. So fehlte z.B. im rechten Bulbus von Fall 2 die Reihe kräftiger Aktivitätszentren, die bei Fall 1 im dorso-lateralen Bereich auftrat (vgl. Abb. 9a und b).

Obwohl die Beurteilung der glomerulären Aktivitätsmuster der beiden Kontrolltiere, die ungefilterter Zimmerluft ausgesetzt worden waren, durch das Fehlen der caudalen Bulbushälfte in Fall 5 erschwert wurde, ließ sich eine prinzipielle Ähnlichkeit erkennen (Abb. 10 a und b). Im Unterschied zu den Mustern nach Pheromonstimulierung, waren die Zentren relativ gleichmäßig über den ganzen Bulbus verteilt und auch in den ventralen Bereichen vorhanden. Auch bei der Beurteilung der Autoradiogramme schienen die Aktivitätsmarkierungen der einzelnen Zentren weniger intensiv zu sein und nach der Rekonstruktion zeigten sie eine geringere Tendenz, sich zu Bändern oder Feldern zu vereinigen. Obwohl die Aktivitätszentren im allgemeinen kleiner waren, als in den Pheromonfällen, schien ihre absolute Zahl vermehrt zu sein.

Pheromonstimulierung

Fall 1

links



rechts

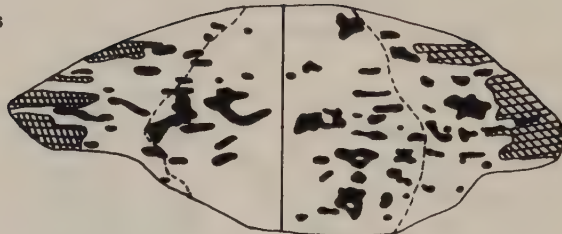


Abb. 9a: Kartographische Rekonstruktion der Aktivitätsverteilung in der glomerulären Schicht des Bulbus olfactorius nach Pheromonstimulierung (Fall 1). Abkürzungen wie in Abb. 3., rostral = oben; caudal = unten

Fall 2

links

d l v m d



rechts

d l v m d

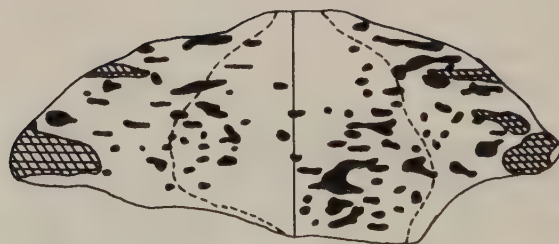


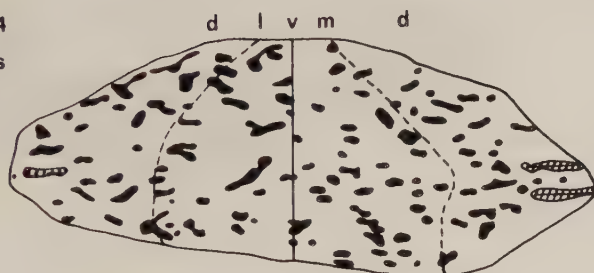
Abb. 9b: Pheromonstimulierung (Fall 2).

Schraffierungen = fehlende oder nicht zu beurteilende
Areale

Luftkontrolle

Fall 4

links



rechts

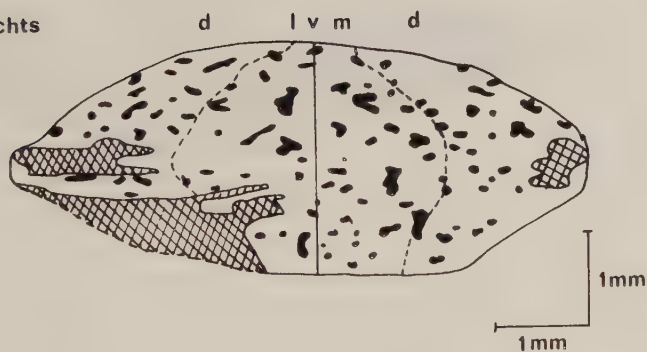
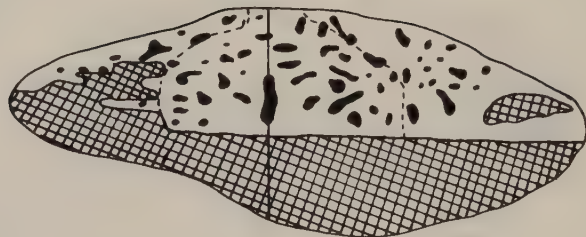


Abb. 10a: Luftkontrolle (Fall 4).

Fall 5

links

d l v m d



rechts

d l v m d

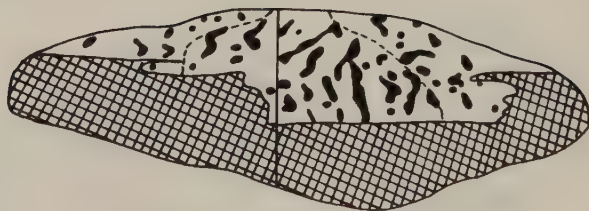


Abb. 10b: Luftkontrolle (Fall 5).

Diskussion

Im histologischen Vergleich der Bulbi olfactorii der drei Altersstufen konnten folgende Veränderungen festgestellt werden:

1. Die Größe des Bulbus nimmt zu.
2. Die Anzahl und Größe der Glomeruli nehmen zu.
3. Die externe plexiforme Schicht wird breiter.
4. Die Mitralzellschicht ist im adulten Tier gestreckter und dünner als beim jungen Kaninchen.
5. Die Schollen der granulären Schicht sind beim adulten Tier größer als beim jungen Kaninchen.
6. Die faserführende Schicht in Ventrikelnähe wird beim adulten Tier breiter.

Der für diese Arbeit wichtigste Befund ist jedoch darin zu sehen, daß beim 5 Tage alte Kaninchen, ebenso wie beim neugeborenen Tier, alle wesentlichen Elemente und Schichten des Bulbus ausgebildet sind, aber im Vergleich zum erwachsenen Tier noch eine erhebliche Entwicklung und Differenzierung stattfindet.

Die Veränderungen in den einzelnen Schichten sind im Rahmen von Reifungs- und Wachstumsvorgängen zu verstehen. So spricht die Größenzunahme und Neubildung der Glomeruli dafür, daß mehr Fasern in ihnen verschaltet werden, da mit dem Reifungsprozess des olfaktorischen Epithels mehr Rezeptorzellen (Meisami et al., 1986) entstehen, deren Axone zu den Bulbi ziehen, um dort verschaltet zu werden. Allerdings kommt der Vorgang der Neuverschaltungen auf glomerulärer Ebene nie völlig zum Abschluß, denn olfaktorische Rezeptorzellen werden als einzige Nervenzellen im ZNS das ganze Leben hindurch neu gebildet (Graziadei und Monti Graziadei, 1978). Das breite Zellband, in welches die Glomeruli bei den jungen Tieren eingelagert sind, stellt das Reservoir der periglomerulären Zellen und Pinselzellen dar, welche durch das enorme Wachstum der Glomeruli verdünnt werden und nach Abschluß der Entwicklung, diese als schmale Bänder umgeben und durchziehen.

Auch in der Mitralzellschicht werden nach der Geburt keine neuen Zellen mehr gebildet (Meisami et al., 1986), deshalb wird diese Schicht durch die allgemeinen Wachstumsvorgänge im Bulbus olfactorius nur gestreckt.

Anders verhält es sich in der granulären Zellschicht. Hier wandern vermutlich, wie bei Maus und Ratte (Altman, 1969), noch in der postnatalen Periode, Zellen aus der periventrikulären Schicht ein, um in der granulären Schicht auszudifferenzieren und an der typischen Schollenbildung dieser Schicht teilzunehmen. Dafür spricht auch, daß beim adulten Tier die periventrikuläre Schicht frei von Nervenzellen ist. Die Zunahme der periventrikulären Schichtbreite dürfte wohl, trotz der offensichtlichen Abnahme an Zellkörpern, auf die Myelinisierung der afferenten und efferenten Axone zurückzuführen sein.

Erst vor wenigen Jahren wurde an neugeborenen Ratten noch eine dritte olfaktorische Region im Bulbus entdeckt und als modifizierter glomerulärer Komplex bezeichnet (Teicher et al., 1980). Dieser erscheint in Transversalschnitten im medio-dorsalen Bereich des Bulbus im Anschluß an die Mitralzellschicht als ein Komplex von 4-6 Glomeruli, medial vom Bulbus olfactorius accessorius. Nach Pedersen et al. (1986) ist er bei den Ratten nach der Geburt aktiv, zu einer Zeit, in der der Hauptbulbus noch nicht genügend entwickelt und noch nicht funktionsfähig ist.

Ein solcher modifizierter glomerulärer Komplex konnte jedoch bei den neugeborenen Kaninchen nicht gefunden werden. Da der Bulbus olfactorius des Kaninchens zum Zeitpunkt der Geburt schon weiter entwickelt ist, als bei der Ratte, dürfte dies der Grund sein, daß ein solcher Komplex nicht so prägnant ausgebildet ist wie bei der Ratte bzw. nicht gefunden wurde. Allgemein scheint der Reifegrad des olfaktorischen Systems des Kaninchens zum Zeitpunkt der Geburt eine Zwischenstellung zwischen Ratte und Meer-

schweinchen einzunehmen. So ist beim Meerschweinchen die Entwicklung des olfaktorischen Systems zum Zeitpunkt der Geburt nahezu abgeschlossen und auch kein modifizierter glomerulärer Komplex bekannt (Astic und Saucier, 1983).

Mit Hilfe der Cytochromoxidase-Färbung werden die Mitochondrien, welche die Energielieferanten der Zelle sind, angefärbt. Abhängig von der jeweiligen Aktivität der Zellen sind mehr oder weniger Mitochondrien vorhanden und dementsprechend werden die Färbungen heller oder dunkler. Die mitochondriale Aktivität kann als Parameter der allgemeinen Zellaktivität verstanden werden (Wong-Riley, 1979). Da sich in den Schnitten durch den Bulbus olfactorius 5 Tage alter Kaninchen mit Hilfe der Cytochromoxidase-Färbung hellere und dunklere Glomeruli unterscheiden ließen, bedeutet das, daß schon in dieser Altersgruppe unterschiedlich aktive Glomeruli vorhanden sind. Im Gegensatz zum Autoradiogramm der 2-DG-Methode wird im Cytochromoxidasebild eine länger anhaltende Aktivität dargestellt. Auf erhöhten Energiebedarf reagieren die Zellen mit vermehrter Bildung von Mitochondrien, deren Entwicklung jedoch einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt. Im Cytochromoxidasebild kann daher nicht zwischen Wachstumsaktivität und funktioneller Aktivität unterschieden werden.

Mit der 2-DG-Methode wird die momentane Aktivität bzw. die Aktivität während der letzten 30-45 Minuten im Autoradiogramm dargestellt. In den Autoradiogrammen ließen sich unabhängig von der Art der verwendeten 2-DG und der Art der Stimulierung unterschiedliche Aktivitäten in den verschiedenen Schichten erkennen. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen zellulären Zusammensetzung dieser Schichten und deren unterschiedlichen Grundumsatz. Einen besonders hohen Energieverbrauch haben die Synapsen (Sharp et al., 1977). Da in der glomerulären Schicht die höchste Konzentration an Synapsen innerhalb des Bulbus vorhanden ist,

weist sie auch ohne spezifische Stimulierung die stärkste 2-DG-Aktivität auf.

Kommt es nun zu einer Erregung der Rezeptoren im olfaktorischen Epithel, so wird diese über die olfaktorischen Nervenfasern in den Bulbus weitergeleitet und in den Glomeruli auf das 2. Neuron der Riechbahn, den Mitralzellen, verschaltet. Jene Glomeruli werden wegen ihrer Aktivität verstärkt markiert. Mit hochempfindlichen Methoden konnte eine unterschiedliche Markierung innerhalb der einzelnen Glomeruli nachgewiesen werden (Benson et al., 1985).

Es ist aber bekannt, daß bei der Geruchsverarbeitung nicht nur exzitatorische Vorgänge ablaufen, sondern auch inhibitorische Einflüsse vorhanden sind, die über dendo-dendritische Synapsen innerhalb der Glomeruli und axo-dendritische Synapsen im periglomerulären Gebiet wirken und zum Aktivitätsmuster beitragen (Pinching und Powell, 1971). Obwohl für die glomeruläre Aktivität, neben inhibitorischen Signalen, die quantitative und qualitative Erregung in der Rezeptorebene verantwortlich ist, sagt die optische Dichte eines aktiven Glomerulus nichts über Informationsgehalt dieser Aktivierung aus.

Um reizspezifische Aktivierung zu beurteilen, ist es üblich ihre Verteilung in der glomerulären Schicht in Kartenform darzustellen (Stewart et al., 1979; Jourdan et al., 1979; Astic und Saucier, 1982 und 1983; Skeen, 1977). Allerdings ist die Güte einer solchen Karte weitgehend von der Vermeidung von Artefakten abhängig, da diese zu einer Fehlinterpretation der Autoradiogramme führen können. Die systematische Modifizierung der 2-DG-Methode während dieser Arbeit zeigte, daß die wesentlichen Artefakte zumeist während des histologischen Arbeitsprozesses entstehen. Doch ist die Zahl möglicher Fehlerquellen so groß, daß eine einwandfreie Darstellung vermutlich nur mit langer Erfahrung und

in großen Versuchsserien zu erreichen ist.

Auch die kartographische Rekonstruktion selbst ist mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. So mußte der Grad der Intensität der einzelnen Aktivitäten unberücksichtigt bleiben, da bei der hier angewendeten qualitativen Auswertung nur die Frage überprüft wurde, ob ein Areal aktiv oder nicht aktiv war, obwohl ein Unterschied in der Intensität der Aktivierungen im Autoradiogramm durchaus erkennbar war. Dennoch änderte diese fehlende Quantifizierung der Aktivität nichts am Ergebnis, d.h. am kartographischen Muster der Aktivitätsverteilung, da nur solche Aktivitäten gewertet wurden, die mindestens in zwei Nachbarschnitten zu erkennen waren und im Nisslbild als Artefakt ausgeschlossen werden konnten.

Die Darstellung der Aktivitäten beschränkte sich auf die glomeruläre Schicht des Hauptbulbus, da im Bulbus olfactorius accessorius in keinem der Fälle Aktivitäten auftraten. Unberücksichtigt blieben auch regelmäßige dorso-caudal auftretende Aktivitäten, auf Höhe des Bulbus olfactorius accessorius, da diesem keine spezifische anatomische Struktur zugeordnet werden konnte. Interessanterweise entsprach die Lokalisation dieser Aktivitäten in etwa der des modifizierten glomerulären Komplexes, der in 2-DG-Arbeiten bei neugeborenen Ratten gefunden wurde (Teicher et al., 1980), was darauf hindeutet, daß dieser Region auch beim Kaninchen eine besondere funktionelle Bedeutung zukommt.

Der intraindividuelle Vergleich der Muster der beiden Bulbi zeigte in allen Fällen, daß zwar eine Ähnlichkeit, aber keine vollständige Übereinstimmung vorhanden ist, obwohl Stimulierung und histologische Verarbeitungsbedingungen für beide Bulbi identisch waren. Die Unterschiede können kaum auf Deformationen während des Gefriervorganges oder eine schiefe Schnittebene zurückgeführt werden und auch einfache anatomische Unterschiede,

die z.B. zu unterschiedlichen Luftströmungsverhältnissen in den Nasenhöhlen und damit zu unterschiedlicher Stimulation der Rezeptoren führen, scheinen relativ unwahrscheinlich zu sein. Vielmehr scheint es, daß funktionell gleiche Rezeptoren des olfaktorischen Epithels nicht streng bilateral symetrisch auf die Bulbi projiziert werden (Le Gros-Clark, 1951; Land, 1973).

Dennoch kann das Auftreten von kontinuierlichen Aktivitätsbändern in mehr oder weniger rostro-caudaler Ausdehnung am besten durch die Projektionsweise der Rezeptoren auf den Bulbus erklärt werden. Land (1973) berichtet, daß Fasern, die von einem begrenzten Gebiet im olfaktorischen Epithel ausgehen, in einem lokalisierten Gebiet der glomerulären Schicht ankommen und sich von dort aus nach caudal ausdehnen.

Die in dieser Arbeit gefundenen individuellen Muster zeigen eine Ähnlichkeit der Versuchsgruppe, die dem Pheromon ausgesetzt war. Die interindividuelle Variation des Musters bei gleicher Reizbedingung ist durchaus typisch und auch bei anderen Untersuchungen gefunden worden (Stewart et al., 1979; Jourdan et al., 1979; Astic und Saucier, 1982 und 1983; Skeen, 1977). Sie wird u.a. auf eine mögliche unterschiedliche Konzentration eines Geruches während des Experimentes und der damit verbundenen unterschiedlich intensiven Stimulierung der Rezeptoren zurückgeführt (Stewart, 1979).

In Arbeiten an Ratten, Meerschweinchen und Spitzhörnchen unterschiedlicher Altersstufen, wurden die Tiere zumeist künstlichen Stimuli wie Kampfer, Amylacetat oder gereinigter Luft, aber auch natürlichen Stimuli wie Nestgeruch oder Raumluft ausgesetzt. Bei künstlichen Gerüchen wurde meist eine auf wenige Stellen beschränkte Aktivität gefunden (Jourdan, 1980; Stewart, 1979). An Spitzhörnchen fand Skeen (1977) sehr deutliche Muster; z.B. führte der Geruch des Sekretes der männlichen Duftdrüse zu

sehr ausgeprägten Aktivitätsfeldern. Eine deutliche Zunahme der Anzahl und Ausdehnung der Aktivitäten mit zunehmendem Alter wurde von Astic und Saucier (1982) an 1 Tag ,9 Tage und 21 Tage alten Ratten gefunden.

Das entstandene Pheromonmuster wurde nicht nur durch das Pheromon, sondern auch den Eigengeruch des Felles und anderer zufällig vorhandenen Verunreinigungen der Luft hervorgerufen. Erst wenn das Pheromon in isolierter Form vorliegt, kann der Versuch unternommen werden ein reines Pheromonmuster zu lokalisieren.

Bei den Luftkontrolltieren blieb in den Rekonstruktionen die Intensität der Aktivitäten unberücksichtigt. Im Autoradiogramm waren jedoch diese Aktivitäten meistens weniger ausgeprägt, als jene der Pheromonstimulierung. Die Ursache für das Entstehen von Mustern könnte in diesen Fällen in einer allgemeinen Aktivität liegen, die durch Wachstum oder erhöhten Grundumsatz der einzelnen Glomeruli bedingt ist. Von solchen Aktivitäten in Kontrolltieren wird auch in anderen Arbeiten (Sharp, 1975 und 1977; Skeen, 1977) berichtet, obwohl normalerweise reine Luft vermehrt zu aktivitätsfreien Gebieten führt (Stewart et al., 1979; Astic und Saucier, 1982).

Da luftspezifische Aktivitäten in gleichen Regionen wie Pheromon-induzierte Aktivitäten lagen, war es nicht möglich eine bestimmte Region zu finden, die für die Wahrnehmung des Zitzen-suchpheromons verantwortlich ist. Es stellt sich nun die Frage, welche Aktivitäten für das Erkennen des Pheromons wichtig sind und das Verhalten auslösen. Durch gezielte Läsionen im Bulbus olfactorius können alternierend verschiedene Teile ausgeschaltet und dann geprüft werden, ob es noch zu einem Zitzensuchverhalten kommt.

Zusammenfassung

In einer anatomischen Untersuchung zur postnatalen Entwicklung des Bulbus olfactorius bei neugeborenen und 5 Tage alten Kaninchen, wurden mit allgemeinen histologischen Methoden neben makroskopischen auch strukturelle Veränderungen gefunden. Bereits in 1 Tag alten Tieren sind alle charakteristischen Schichten des Bulbus vorhanden; diese sind aber bei 5 Tage alten Kaninchen deutlicher differenziert, wobei im Vergleich zum adulten Tier die glomeruläre und die granuläre Schicht besonders betroffen sind. Darüberhinaus lassen sich in Cytochromoxidase gefärbten Schnitten unterschiedlich dunkel angefärbte Glomeruli erkennen, deren Intensität u.a. einen Parameter für die Langzeitaktivität darstellt.

Die funktionelle Aktivität der glomerulären Schicht während Geruchsstimulation wurde mit Hilfe der 2-DG-Methode an 20 fünf Tage alten Kaninchen überprüft und der anatomischen Struktur gegenübergestellt. Um diese noch relativ neue Methode den Erfordernissen anzupassen, wurden drei verschiedene DG-Arten getestet, verschiedene Injektionsarten überprüft, unterschiedliche Präparations- und Gefriermethoden verwendet und mehrere Expositionszeiten benutzt. Während der Versuche wurden die Jungtiere entweder auf einer Kanichenmutter dem Geruch des Zitzensuchpheromons oder ungefilterter Raumluft, als Kontrolle, ausgesetzt.

Durch Vergleich der Autoradiogramme mit den korrelierenden Nisslbildern konnten in der glomerulären Schicht aktive von nicht aktiven Bereichen unterschieden werden. Durch Rekonstruktion der glomerulären Schicht mit ihren Aktivitäten konnten für beide Versuchsbedingungen typische Aktivitätsmuster gefunden werden. Während die Pheromon-Muster größere und geordnetere Aktivitätsfelder aufwiesen, waren bei den Luftkontrollen die Aktivitäten wesentlich kleiner und gleichmäßiger verteilt.

Summary

Pheromon-induced activity in the olfactory bulb of newborn rabbits: a neuroanatomical study using the 2-deoxyglucose method.

In an anatomical study of the development of the olfactory bulb in the rabbit, histological examination of newborn and 5 day old animals showed both macroscopic and microscopic morphological changes to occur during the first few days of life. The characteristic layers of the bulb, already present at birth, become better differentiated by day 5, with the glomerular and granule cell layers being particularly affected. Further, application of the cytochrome oxydase method revealed differences between individual glomeruli in the intensity of staining and thus presumably differences in long-term activity.

Activity of the glomerular layer in response to odour stimulation was further examined in 20 five-day-old rabbits using the 2-deoxyglucose method and comparing the results with the corresponding morphological material. In an attempt to refine this still relatively new method, three sorts of deoxyglucose were tested, together with different methods of administration and different histological and dark room procedures. During the experiments pups were exposed to either the odour of rabbit nipple-search pheromone or, in the control condition, to unfiltered air.

Comparison of the 2-DG-autoradiograms with the corresponding Nissl material revealed marked regional differences in activity within the glomerular layer. Reconstructing this layer and mapping onto it the regions of high activity resulted in different basic patterns of activation for the two stimulus conditions. Whereas the pheromone pattern consisted of extensive groupings of relatively large areas of activity, the control condition was distinguished by considerably smaller, evenly distributed areas.

Literatur

Altman, J.

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain , with special reference to persisting neurogenesis in th olfactory bulb
J. Comp. Neuro. 137: 433-458 (1969)

Alberts, J.R.

Huddling by rat pups: group behavioral mechanism of temperature regulation and energy conservation
J. Comp. Psychol. 92: 231-245 (1978)

Allison, A.C. and Turner Warwick, R.T.

Quantitativ observations on the olfactory system of the rabbit
Brain 72: 186-197 (1949)

Astic, L. and Saucier, D.

Ontogenesis of the functional activity of rat olfactory bulb: Autoradiographic study with the 2-deoxyglucose method
Developm. Brain Res. 2: 1243-1256 (1982)

Astic, L. and Saucier, D.

Ontogenesis of the functional activity of guinea pig olfactory bulb: Autoradiographic study with the 2-deoxyglucose method
Developm. Brain Res. 16: 257- 263 (1983)

Bell, G.A., and Mellor, J.D.

Olfactory mitral cell integrity after freeze fixation
Neurosc. Letters 46: 197-201 (1984)

Bell, G.A.

Laboratory procedure for (3H)-2 DG autoradiography
Persönliche Mitteilung

- Benson, T.E., Burd, G.D., Greer, C.A., Landis, D.M.D. and Sheperd, G.M.
High-resolution 2-deoxyglucose autoradiography in quick-frozen slabs of neonatal rat olfactory bulb
Brain Res. 339: 67-78 (1985)
- Blass, E.M. and Teicher, M.H.
Suckling
Science 210: 15-22 (1980)
- Cajal, S.R.Y.,
Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres Tome II. Paris, Maloine (1911)
- Deutsch, J.A.
Nest building behaviour of domestic rabbits under semi-natural conditions
Brit. J. Anim. Behav. 5: 53-54 (1957)
- Distel, H. and Hudson, R.
Nipple-search performance by rabbit pups: Changes with age and time of day
Anim. Behav. 32: 501-507 (1984)
- Distel, H. and Hudson, R.
The contribution of the olfactory and tactile modalities to the performance of nipple-search behavior in newborn rabbits
J. Comp. Physiol. A 157: 599-605 (1985)
- Ebbesson, S.O.E.
The selective silver-impregnation of degenerating axons in nonmammilian species
In: Nauta, W.J.H. and Ebbesson, S.O.E. (eds.) Contemporary research methods in neuroanatomy, Springer, Berlin (1970)
- Gallistel, C.R., Karreman, G.A. and Reivich, M.
(14C) deoxyglucose uptake marks systems activated by rewarding brain stimulation
Brain Res. Bull. 2: 149-152 (1977)

Gallyas, F.

Silver stain of myelin by means of physical development
Neurol. Res. 1: 203-209 (1979)

Graziadei, P.P.C. and Monti Graziadei, G.A.

Continuous nerve cell renewal in the olfactory system.
In: Jacobson, M. (ed.) Handbook of Sensory Physiology Vol. IX
Springer, New York (1978)

Greer, C.A., Stewart, W.B., Teicher, M.H. and Sheperd, G.M.

Functional development of the olfactory bulb and a unique
glomerular complex in the neonatal rat
J. Neurosci. 2: 1744-1759 (1982)

Greer, C.A., Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Sheperd, G.M.

Topographical and laminar localisation of 2-deoxyglucose
uptake in rat olfactory bulb induced by electrical stimula-
tion of olfactory nerves
Brain Res. 217: 279-293 (1981)

Grota, L.J. and Adler, R.

Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus
norvegicus*
Anim. Behav. 17: 722-729 (1969)

Hand, P.J.

The 2-deoxyglucose method.
In: L. Heimer and M.J. Robards (eds.) Neuroanatomical tract-
tracing methods, New York, Plenum Press (1981)

Hubel, D.H. and Wiesel, T.N.

Functional architecture of Macaque monkey visual cortex
Proc. R. Soc. Lond. B. 198: 1-59 (1977)

Hudson, R. and Distel, H.

The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest
Behaviour 79: 255-271 (1982)

Hudson, R. and Distel, H.

Nipple location by newborn rabbits: Behavioural evidence for
pheromonal guidance
Behaviour 85: 260-275 (1983)

Hudson, R. and Distel, H.

Nipple-search pheromone in rabbits: Dependence on season and reproductive state

J. Comp. Physiol. A 155: 13-17 (1984)

Hudson, R.

Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior?

Developm. Psychobiol. 18: 575-585 (1985)

Hudson, R. and Distel, H.

Olfactory guidance of nipple-search behavior in newborn rabbits

In: Breipohl, W. and Apfelbach, R. (eds.) Ontogeny in Olfaction in Vertebrates, Springer, Berlin (im Druck)

Jacobson, S. and Trojanowsky, J.Q.

The cells of origin of the corpus callosum in rat, cat and rhesus monkey

Brain Res. 74:557-562 (1974)

Jarvis, C.D., Mishkin, M., Shinohara, M., Sakurada, O., Miyaoka, M. and Kennedy, C.

Mapping the primate visual system with the (14C)-2-deoxyglucose technique

Neurosci. Abstr. 4: 632 (1978)

Jourdan, F., Duveau, A., Astic, L. and Holley, A.

Spatial distribution of (14)-2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours

Brain Res. 188: 139-154 (1980)

Kennedy, C.M., Des Rosiers, H., Jehle, J.W., Reivich, M., Sharp, F. and Sokoloff, L.

Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rat with (14C) deoxyglucose

Science 187: 850- 853 (1975)

Land, L.J.

Localized projection of olfactory nerves to rabbit olfactory bulb

Brain Res. 63: 153-166 (1973)

Le Gros Clark, W.E.,

The projection of the olfactory epithelium on the olfactory bulb in the rabbit

J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 14: 1-10 (1951)

Lincoln, D.W.

Suckling: A time-constant in the nursing behaviour of rabbit

Physiol. Behav. 13: 711-714 (1974)

Lohmann, A.H.M., and Lammers, H.J.,

On the structure and fibre connections of the olfactory centres in mammals

In: Zottermann, Y. (ed.) Progress in Brain Research
Vol. 23 Sensory Mechanism, Elsevier, Amsterdam (1967)

Meisami, E., Leu, J., Hudson, R. and Distel, H.

Marked postnatal increase in the total number of olfactory neurons and surface area of the mucosa in the rabbit

9 th Int. Symp. Olfact. Taste, Abstract (1986)

Meredith, M.

Sensory physiology of pheromone communication.

In: Vandebergh, J.G. (ed.) Pheromones and Reproduction in Mammals, Academic Press, New York (1983)

Montero, V.M., Guillery, R.W. and Woolsey, C.N.

Retinotopic organization within the thalamic reticular nucleus demonstrated by a double label autoradiographic technique

Brain Res. 138: 407-421 (1977)

Moulton, D.G.

Olfaction

In: Masterton, R.B. (ed.) Handbook of Behavioral Neurobiol. Vol. I: Sensory Integration, Plenum Press, New York, (1978)

- Pedersen, P.E., Greer, C.A. and Sheperd, G.M.
Early development of olfactory function
In: Blass, E. M. (ed.) Handbook of Behavioral Neurobiol.,
Plenum Press, New York (1986)
- Pinching, A.J. and Powell, T.P.
The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb
J. Cell. Sci. 9: 347-377 (1971)
- Rheingold, H.L.
Maternal behaviour in the dog.
In: Rheingold, H.L. (ed.) Maternal behaviour in mammals
New York, John Wiley (1963)
- Romeis, B.
Mikroskopische Technik
16. Aufl., R. Oldenburg Verlag, München (1968)
- Rosenblatt, J.S. and Siegel, H.I.
Factors governing the onset and maintenance of maternal
behavior among mammals
In: Gubernick, D.J. and Klopfer, P.H. (eds.) Parental care
in mammals, Plenum Press, New York (1981)
- Schley, P.
Geruchssinn und Saugverhalten bei Jungkaninchen
Kleintierpraxis 26: 261-263 (1981)
- Schneirla, T.C., Rosenblatt, J.S. and Tobach, E.,
Maternal behaviour in the cat.
In: Rheingold, H.J. (ed.) Maternal behaviour in mammals
New York, John Wiley (1963)
- Sharp, F.R., Kauer, J.S. and Sheperd, G.M.
Local sites of activity related glucose metabolism in rat
olfactory bulb during olfactory stimulation
Brain Res. 98: 596-600 (1975)
- Sharp, F.R., Kauer, J.S. and Sheperd, G.M.
Laminar analysis of 2-deoxyglucose uptake in the olfactory
bulb and olfactory cortex of rabbit and rat
J. Neurophysiol. 40: 800-813 (1977)

Shuleikina-Turpaeva, K.V.

Sensory organization of alimentary behavior in the kitten
Adv. Study Behav. (im Druck)

Skeen, L.C.

Odor-induced patterns of deoxyglucose consumption in the
olfactory bulb of the tree shrew, *Tupaia glis*
Brain Res. 124: 147-153 (1977)

Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M., H.,
Patlack, C., S., Pettigrew, K., D., Sakurada, O. and
Shinohara, M.

The (14C)deoxyglucose method for the measurement of local
cerebral glucose utilisation: Theory, procedure, and normal
values in the conscious and anesthetized albino rat
J. Neurochem. 28: 897-916 (1977)

Sokoloff, L.

Relation between physiological function and energy
metabolism in the central nervous system
J. Neurochem. 29: 13-26 (1977)

Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Sheperd, G.M.

Functional organisation of rat olfactory bulb analysed by
the 2-deoxyglucose method
J. comp. Neurol. 185: 715-734 (1979)

Stryker, M.P.

Protocol for qualitative use of Sokoloff's 2-deoxy-
glucose autoradiographic method for determinig local
rates of glucose utilisation in neural tissue
In: 1978 Short course: Neuroanatomical techniques
Society for Neuroscience St. Louis, Missouri (1978)

Teicher, M.H. , Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Sheperd, G.M.

Suckling pheromon stimulation of a modified glomerular
region in the developing rat olfactory bulb revealed by the
2-deoxyglucose method
Brain Res. 194: 530-535 (1980)

Venge, O.

The influence of nursing behaviour and milk production on early growth in rabbits

Animal. Behav. 11: 500-506 (1963)

Wong-Riley, M.

Changes in the visual system of monocular sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry

Brain Res. 171: 11-28 (1979)

Wysocki, C.J.

Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction

Neurosci. Biobehav. Rev. 3: 301-342 (1979)

Zarrow, M.X., Dennberg, V.M., and Anderson, C.O.

Rabbit: Frequency of suckling in the pup

Science 150: 1835-1836 (1965)

Anhang

Aufstellung der verwendeten Lösungen und histologischen Prozeduren

Sörensen-Puffer

I. KH_2PO_4 MG = 136,1 / 0,1m = 13,61 g auf 1000ml Aqua dest.

II. Na_2HPO_4 MG = 177,99 / 0,1m = 17,799g auf 1000ml Aqua dest.

Für pH 7,4 muß ein Mischverhältnis von

(I) 1 Teil + (II) 3 Teile eingestellt werden.

Um den gewünschten pH-Wert zu erzielen muß mit HCl bzw. NaOH der pH eingestellt werden.

Formolfixativ (Romeis, 1968)

Substanz: Formaldehydlösung 40% Fa. Merck 4002
Aqua dest.

Herstellung: 1 Teil Formol + 9 Teile Aqua dest.
z.B. 100ml Formol + 900ml Aqua dest.
Ergibt eine 4% Formaldehydlösung.

Perfusionsfixativ nach Jacobson und Trojanowski (1974)

Substanz	für 1 l
(1) Paraformaldehyd	5g + 100ml Aqua dest.
(2) Glutaraldehyd 25%	100ml
(3) $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,125g
(4) Na-Cacodylat	3,21g + 50ml Aqua dest.
(5) Na-Cacodylat pH 7,2	16,05g + 750ml Aqua dest.
Reagenzien: 1. Paraformaldehyd	5% Merck Nr. 4005
2. Glutaraldehyd	25% Merck Nr. 820603
3. $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01% Roth Nr. 7729
4. Na-Cacodylat-Puffer	0,09M Roth Nr. 5169 pH 7,2
5. Na-Cacodylat in Aqua dest.	6,42%

Herstellung: Paraformaldehyd (1) in Aqua dest. bei 60 Grad C und einigen Tropfen NaOH lösen, zu (4) Na-Cacodylat gießen, auf pH 7,2 einstellen (25% HCl), dazu $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (3) und Glutaraldehyd (2) gießen auffüllen mit Na-Cacodylatpuffer (5) auf die gewünschte Menge, einstellen auf pH 7,2.

Schnelleinbettung für Gefrierschnitte (Ebbesson, 1970)

Material:

10ml Eigelb und 500 μ l Glutaraldehyd (25%).

Einbettung:

Eigelb von Eiweiß trennen, das gewonnene Eigelb läßt man über ein Kleenextuch rollen, um das restliche Eiweiß zu entfernen. Am Rande des Tuches wird das Eigelb aufgestochen und in einem Gefäß aufgefangen.

Zum Eigelb gibt man unter ständigem Rühren Glutaraldehyd; diese Mischung wird dann sofort über das einzubettende Material gegossen.

Nach 5-10 Minuten kann der Block getrimmt und geschnitten werden.

Nisslfärbung mit Thionin (Romeis, 1968)

Herstellung der Stammlösung:

1g Thionin

10ml Äthanol abs. rein

30 min. stehen lassen, 500ml Aqua dest. zugeben, erwärmen, nicht kochen, abkühlen lassen, filtrieren.

Herstellung der Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. wie 1 : 2 .

Ansatz kann varriert werden. Farbe immer filtern!

Färbearbeitung für Thionin:

Vor den Färbeschritten werden die Schnitte in der Alkoholreihe dehydriert.

Thioningebrauchslösung:	15 min. (oder kürzer)
-------------------------	-----------------------

70% Alkohol	kurz spülen
-------------	-------------

96% Alkohol mit Eisessig	1-2 min.
--------------------------	----------

96% Alkohol	1-2 min.
-------------	----------

Isopropanol 100%	3-5 min.
------------------	----------

Xylol I	3-5 min.
---------	----------

Xylol II	3-5min.
----------	---------

Eindecken mit DePex.

Cytochrom-Oxidase-Färbung

Wong-Riley, Brain.Res. 171: 11-78 (1979)

1. Perfusion mit Perfusionsfixativ nach Trojanowski,
mit Sörensenpuffer und 4% Zucker nachspülen.
2. Nachfixieren über 1 Stunde oder länger.
3. Schnitte in Sörensen mit Zucker auffangen.

Vorinkubation:

4. Schnitte in Sörensen "waschen".
5. 1% Co Cl_2 : 7,5ml in 300ml Sörensen zugeben, darin die Schnitte
10 min. inkubieren.
6. Schnitte 10 min. in Sörensen "waschen".
7. Schnitte in Sörensen mit 4% Zucker über 5 min bei 37 Grad C.

Hauptinkubation:

8. 50mg DAB
90ml Sörensen + 4% Zucker
25mg Cytochrom C, Typ III, Sigma.

In dieser Lösung bleiben die Schnitte im Dunkeln für 1-2
Stunden bei 37 Grad C stehen. Anschließend werden die Schnitte
mehrmals im Sörensen gewaschen.

9. Aufziehen, Lufttrocknen und Eindecken.

Markscheiden-Silberimprägnation

Gallyas, F., Neurol. Res. 1: 203-209 (1979)

Anwendung: Myelinfärbung in Gefrier-, Paraffin- oder Celloidin-material, 5-100µm Schnitte.

Fixation: Formol (1 Tag - Monate)

Vorbehandlung: entparaffinieren, Celloidin entfernen,
Gefrierschnitte in 70% Alkohol 45 min.
Aqua dest. 2x 5min.

1.	2 Teile Pyridin 1 Teil Essigsäure-Anhydrid im Schüttler	30 min.
----	---	---------

2.	Aqua dest.	kurz
----	------------	------

3.	70% Alkohol	15 min.
----	-------------	---------

4. Imprägnation:

0,95g Amonium-Nitrat

1,0 g Silbernitrat

1000ml Aqua dest.

3 ml 4% NaOH mit Pipette zugeben

Rühren, bei 30 Grad C über 30 min., pH wird mit NaOH auf 7,6 eingestellt.

5.	waschen mit 0,5% Essigsäure	30 min.
----	-----------------------------	---------

6. Entwicklung:

Physikalischer Entwickler, jeweils frisch mischen.

Stammlösung (10 A + 7 B) + 3 C bei 20 Grad C 10 min.

z.B. 50 ml Lsg.A: Na- Carbonat 5% (ohne H O)

35 ml Lsg.B: Amonium-Nitrat 0,2%

Silbernitrat 0,2%

Wolframatokieselsäure 1%

Lösungen A und B: rühren

15 ml Lsg.C: Lsg.B + 0,7 Teile Formol 37%

langsam zugeben.

7. Stoppen: mit 0,5% Essigsäure, unter dem Mikroskop die Färbung prüfen, evtl. zurück in den Entwickler.

- | | | |
|-----|-------------------------------------|-----------|
| 8. | 0,5% Essigsäure | 5 min. |
| 9. | 1% Goldchlorid | 1 min. |
| 10. | 0.5% Essigsäure | 2x 5 min. |
| 11. | 70% Alkohol, entwässern, eindecken. | |

Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die gewährte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit möchte ich Herrn Privatdozenten Dr. Hans Distel meinen herzlichen Dank aussprechen. Gleichzeitig bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, insbesondere bei Frau Ingrid Küpfer, Frau Dr. Robyn Hudson, Fräulein Christa Gebele und Fräulein Heliane Lössl, sowie bei Herrn Prof. Dr. E. Pöppel dafür, daß ich die Arbeit an seinem Institut durchführen durfte. Herrn Prof. Dr. H.E. König danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die gewährte Unterstützung recht herzlich.

Lebenslauf

Name:	Johann Michael Martin
Geburtsdatum:	05.03.1958
Geburtsort:	Grieskirchen
Vater:	Franz Martin, Landwirt
Mutter:	Anna Martin, geb. Gusterer
Ausbildung:	
1964-1969:	Volksschule Taufkirchen, Ndb.
1969-1979:	Karl von Closen Gymnasium, Eggenfelden/Gern
1979:	Abitur
1979-1985:	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität, München
Mai 1985:	Tierärztliches Staatsexamen
1985:	Approbation

